



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 238**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04810418 .6**

(96) Fecha de presentación : **04.11.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1680141**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

(54) Título: **Procedimientos de terapia para tumores sólidos que expresan el antígeno de superficie celular CD40.**

(30) Prioridad: **04.11.2003 US 517337 P**
26.11.2003 US 525579 P
27.04.2004 US 565710 P
27.04.2004 US 565634 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2010

(73) Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, Inc.
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US
XOMA TECHNOLOGY Ltd.

(72) Inventor/es: **Yabannavar, Asha;**
Zaror, Isabel;
Luqman, Mohammad y
Long, Li

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 348 238 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de terapia para tumores sólidos que expresan el antígeno de superficie celular CD40.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a medicamentos para el tratamiento, y a procedimientos *in vitro* para la inhibición del crecimiento de, tumores sólidos usando anticuerpos humanos anti-CD40 antagonistas, comprendiendo los tumores sólidos células del carcinoma que expresan el antígeno de superficie celular CD40.

10 **Antecedentes de la invención**

CD40 es un antígeno de superficie celular de 55 kDa presente en la superficie de las células B normales y células B neoplásicas humanas, células dendríticas, células presentadoras de antígenos (APC), células endoteliales, células monocíticas y epiteliales, algunos carcinomas epiteliales y muchos tumores sólidos, incluyendo cánceres de pulmón, mama, ovario y colon. Las células transformadas de pacientes con linfomas de células B de bajo y alto grado, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y enfermedad de Hodgkin expresan el antígeno CD40. La expresión de CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia mieloblástica aguda y en 50% de los linfomas relacionados con el SIDA. Las células B malignas de diversos tumores de linaje de células B expresan un alto grado de CD40 y parecen depender de la señal de CD40 para la supervivencia y proliferación. Carcinomas que expresan CD40 incluyen carcinoma de vejiga urinaria (Paulie y col. (1989) J. Immunol. 142: 590-595; Braesch-Andersen y col. (1989) J. Immunol. 142: 562-567), carcinoma de mama (Hirano y col. (1999) Blood 93: 2999-3007; Wingett y col. (1998) Breast Cancer Res. Treat. 50: 27-36); cáncer de próstata (Rokhlin y col. (1997) Cancer Res. 57: 1758-1768), carcinoma de células renales (Klutzy y col. (1997) Cancer Res. 57: 891-899), carcinoma nasofaríngeal no diferenciado (UNPC) (Agathangelou y col. (1995) Am. J. Pathol. 147: 1152-1160), carcinoma de células escamosas (SCC) (Amo y col. (2000) Eur. J. Dermatol. 10: 438-442; Posner y col. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2261-2270), carcinoma papilar del tiroides (Smith y col. (1999) Thyroid 9: 749-755), melanoma maligno cutáneo (van den Oord y col. (1996) Am. J. Parasol. 149: 1953-1961), mieloma múltiple (Maloney y col. (1999) Semin. Hematol. 36 (1 Suppl 3): 30-33), células de Hodgkin y Reed-Sternberg (células cebadas) (Gruss y col. (1994) Blood 84: 2305-2314), carcinoma gástrico (Yamaguchi y col. (2003) Int. J. Oncol. 23 (6): 1697-702), sarcomas (véase, por ejemplo, Lollini y col. (1998) Clin. Cancer Res. 4 (8): 1843-849, discussing human osteosarcoma and Ewing's sarcoma), y carcinoma de hígado (véase, por ejemplo, Sugimoto y col. (1999) Hepatology 30 (4): 920-26, discussing human hepatocellular carcinoma).

El antígeno CD40 está relacionado con el receptor del factor de crecimiento de los nervios (NGF) humano, el receptor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y Fas, sugiriendo que CD40 es un receptor para un ligando con funciones importantes en la activación de las células B. Se ha demostrado que juega un papel crítico en el desarrollo y función de las células B normales. La expresión de CD40 en las APC desempeña una función coestimuladora importante en la activación de linfocitos T ayudantes y linfocitos T citotóxicos. El receptor de CD40 se expresa en células T activadas, plaquetas activadas y en células de músculo liso vascular inflamadas. Los receptores de CD40 pueden encontrarse también en eosinófilos, membranas sinoviales en la artritis reumatoide, en fibroblastos dérmicos y en otras células no linfoides. La unión de CD40 al receptor de CD40 estimula la proliferación y diferenciación de las células B, la producción de anticuerpos, el cambio de isotipo y la generación de memoria de células B. Mediante algunas células del carcinoma muestra altos niveles de expresión de CD40, no se entiende bien el papel de la señalización de CD40 en relación a la expresión de CD40 en estas células de cáncer.

El documento WO-A-96/18413 desvela el tratamiento de carcinomas en células epiteliales, y la prevención de proliferación de células epiteliales, usando un conector del receptor CD40. El conector del receptor de CD40 se puede usar junto con al menos un agente anti-neoplástico y/o inductor de CD40. Se describen anticuerpos inmunoregulatorios en el documento WO-A-02/060485, que describe una terapia de anticuerpo de combinación para el tratamiento de cánceres de células B usando un anticuerpo inmunoregulatorio, especialmente un anticuerpo anti-B7, anti-CD23 o anti-CD40L y un anticuerpo de eliminación de células B, especialmente anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22 o anti-CD37.

Se representan una mayoría de casos de cáncer con los denominados tumores sólidos. Dada su alta incidencia, se necesitan procedimientos para el tratamiento de estos cánceres.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva,

para uso en el tratamiento de un sujeto humano con un tumor sólido que comprende células del carcinoma que expresa el antígeno CD40.

La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano con un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan el antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan el antígeno CD40, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

5 c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

10 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva,

para uso en la inhibición del crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40.

15 La invención también proporciona el uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para la inhibición del crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresa el antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

20 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

30 c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

35 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

40 Otros aspectos de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Breve resumen de la divulgación

45 Se desvelan procedimientos de tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, en el que las células de carcinoma del tumor sólido expresan el antígeno de superficie celular CD40. Los procedimientos comprenden el tratamiento del sujeto con un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o un fragmento de unión al antígeno del mismo que está exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40 en una célula que expresa CD40 humana. La unión del anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista (o fragmento de unión al antígeno adecuado del mismo que comprende la porción Fc del anticuerpo anti-CD40 antagonista) a antígeno CD40 expresado en células del carcinoma da lugar a citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC) -citólisis dependiente de estas células del carcinoma. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 antagonistas se administran en combinación con uno o más protocolos de terapia de cáncer distintos, incluyendo, pero sin limitarse a estos, cirugía, terapia con radiación; quimioterapia, terapia con citosina, u otro anticuerpo monoclonal que se prevea para uso en el tratamiento del tumor sólido. Tumores sólidos que se pueden tratar o prevenir con los procedimientos de la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a estos, cáncer de ovarios, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de células pequeñas del pulmón), mama, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, de cuello uterino, próstata, nasofaríngeal, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas (incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing). Se desvelan también procedimientos para la inhibición del crecimiento de tumores sólidos que comprenden células de carcinoma que expresan CD40.

65 Los anticuerpos adecuados para uso en los procedimientos de la invención incluyen los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, que tienen una fuerte afinidad por CD40 y se caracterizan por tener una constante de equilibrio de disociación (K_D) de al menos 10^{-6} M, de preferencia al menos 10^{-7} M hasta aproximadamente 10^{-8} M, de más preferencia al menos aproximadamente 10^{-8} M hasta aproximadamente 10^{-12} M. Los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de unión al antígeno que son adecuados para uso en los procedimientos de la invención son capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, particularmente

una célula de carcinoma humano de un tumor sólido. Están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas. Como se demuestra para células B normales y neoplásicas humanas que expresan CD40. Los anticuerpos monoclonales adecuados tienen regiones humanas constantes; de preferencia tienen también regiones del marco total o parcialmente humanizadas; y de mayor preferencia son anticuerpos completamente humanos o sus fragmentos de unión al antígeno.

Los ejemplos de tales anticuerpos monoclonales son los anticuerpos denominados en el presente documento como CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se pueden producir de forma recombinante; los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 12.12); un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7; la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 3; y los fragmentos de estos anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno que retienen la capacidad de unirse específicamente al CD40 humano, y que están exentos de actividad agonista significativa pero que exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas, como se demuestra para células B normales y neoplásicas humanas que expresan CD40. Los ejemplos de tales anticuerpos monoclonales también incluyen un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12 o el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular del hibridoma 5.9; un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12; un anticuerpo monoclonal que compete con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en un ensayo de unión competitivo; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, donde el fragmento retiene la capacidad de unión específica al antígeno CD40 humano y muestra actividad antagonista cuando se une a este antígeno, como se demuestra para células B normales y neoplásicas humanas que expresan CD40.

En una realización de la divulgación, los procedimientos de tratamiento comprenden administrar a un paciente una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos antagonistas anti CD40 antagonistas adecuados o sus fragmentos de unión al antígeno. Una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 o su fragmento está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el procedimiento de tratamiento puede comprender una administración única de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 o sus fragmentos de unión al antígeno.

Los anticuerpos antagonistas anti CD40 identificados en el presente documento como adecuados para uso en los procedimientos de la invención pueden modificarse. Las modificaciones de estos anticuerpos antagonistas anti CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti CD40 quiméricos inmunológicamente activos, anticuerpos anti CD40 humanizados y anticuerpos anti CD40 murinos inmunológicamente activos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligeras y pesadas del mAb CHIR-12.12. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 2), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 2), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 2) de la cadena ligera se muestran en la Figura 1A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 4), variable (residuos 20-139 de SEC ID N° 4), y constante (residuos 140-469 de SEC ID N° 4) de la cadena pesada se muestran en la Figura 1B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 mostrada en la Figura 1B refleja una sustitución de un residuo alanina por un residuo serina en la posición 153 de SEC ID N° 4. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 se presenta en SEC ID N° 5.

La Figura 2 muestra las secuencias codificadoras para la cadena ligera (Figura 2A; SEC ID N° 1) y la cadena pesada (Figura 2B; SEC ID N° 3) para el mAb CHIR-12.12.

La Figura 3 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-5.9. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 6), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 6), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 6) de la cadena ligera se muestran en la Figura 3A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 7), variable (residuos 20-144 de SEC ID N° 7), y constante (residuos 145-474 de SEC ID N° 7) de la cadena pesada se muestran en la Figura 3B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 mostrada en la

Figura 3B refleja una sustitución de un residuo alanina por un residuo serina en la posición 158 de SEC ID N° 7. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAB CHIR-5.9 se presenta en la SEC ID N° 8.

La Figura 4 muestra la secuencia codificadora (Figura 4A; SEC ID N° 9) para la isoforma corta del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4B; SEC ID N° 10), y la secuencia codificadora (Figura 4C; SEC ID N° 11) para la isoforma larga del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4D).

La figura 5 muestra actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en las líneas celulares de cáncer de ovarios SKO3 (figura 5A) y Hey (figura 5B), la línea celular de cáncer de células escamosas de la piel A431 (figura 5C) y la línea celular de cáncer de colon HCT116 (figura 5D).

La figura 6 muestra actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 (figura 6A) y MDA-MB435 (figura 6B) y las líneas celulares de cáncer de pulmón NCI-H460 (figura 6C) y SK-MES-1 (figura 6D).

La Figura 7 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 (donado 5.9 en la figura) y CHIR-12.12 (denotado 12.12 en la figura) usando un modelo de cáncer de colon por xenoinjerto basado en la línea celular HCT116 del carcinoma de colon humano.

La figura 8 muestra los efectos de anticuerpo monoclonal anti-CD40 administrado por vía intraperitoneal CHIR-12.12 (denotado 12.12 en la figura) o anticuerpo monoclonal anti-HER2 Herceptin® en porcentaje de supervivencia en un modelo murino ortotópico no estadificado de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios humana SKOV3i.p.1.

La figura 9 compara los efectos de anticuerpo monoclonal administrado por vía intraperitoneal frente a vía intravenosa CHIR-12.12 (denotado 12.12 en la figura) o Herceptin® en porcentaje de supervivencia en un modelo murino ortotópico no estadificado de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios humana SKOV3i.p.1.

La Figura 10 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 (denotado 12.12 en la figura) y CHIR-5.9 (donado 5.9 en la figura) frente a la observada para Herceptin® usando un modelo murino estadificado de cáncer de ovarios basado en la línea celular de cáncer de ovarios humana SKOV3i.p.1.

La Figura 11 muestra la temperatura de fusión de CHIR-12.12 en formulaciones de diferente pH medidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Descripción detallada de la invención

“Tumor”, según se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. El término “tumor sólido” se refiere a un cáncer o carcinoma de tejidos corporales distintos de sangre, médula ósea y sistema linfático.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que está típicamente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer gástrico, próstata y cáncer de piel.

Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión para un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto a los anticuerpos como a otras moléculas análogas a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo son producidos, por ejemplo, en niveles bajos por el sistema linfático y en niveles aumentados por los mielomas.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y abarca los anticuerpos totalmente estructurados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno (por ejemplo, Fab’, F’(ab)2, Fv, anticuerpos de cadena simple, fragmentos divalentes o diabodies), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

El término “anticuerpo monoclonal” según se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se dan en la naturaleza que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los “anticuerpos nativos” y las “inmunoglobulinas nativas” son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena ligera y pesada también tiene enlaces disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable

en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio de variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

5 El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de la lámina β , y en algunos casos forman parte de la misma. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col. (1991) NIH Publ. N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669).

Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la unión del receptor de FC (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, la opsonización, la iniciación de la citotoxicidad dependiente del complemento y la desgranulación de los mastocitos.

El término “región hipervariable” cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los residuos del “marco” o “FR” son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, de preferencia la región de unión al anticuerpo o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$ y fragmentos Fv; fragmentos divalentes; anticuerpos lineales (Zapata y col. (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062); moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual “Fc”, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y aún es capaz de formar un entrecruzamiento con el antígeno.

“Fv” es el fragmento mínimo del anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión del antígeno completo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región está constituida por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. En una especie Fv de cadena única, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible tal que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura “dímera” análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . En conjunto, las seis CDR confieren la especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para el Fab' en el que el(los) residuo(s) cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se

denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los isotipos diferentes tienen funciones efectoras diferentes. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 humanos median la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

La palabra “marcador” cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente a los anticuerpos para generar un anticuerpo “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Los radionúclidos que pueden servir como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. El marcador puede también ser una entidad no detectable tal como una toxina.

El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea parcial o totalmente, inhibe o neutraliza una actividad biológica de una diana nativa dada a conocer en el presente documento o su transcripción o traducción.

“Vehículos” según se usa en el presente documento incluye los vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al mismo en las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluido el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (con menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y Pluronic. La administración “en combinación con” otro u otros agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (al mismo tiempo) y la administración consecutiva en cualquier orden.

Una “célula huésped”, según se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o a una célula o línea celular de eucariota cultivada como una entidad unicelular que puede usarse, o se ha usado, como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluye a la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una célula única puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la original, por las mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. De preferencia, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC). Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, siendo las de preferencia las PBMC y las células NK. Los anticuerpos que tienen actividad ADCC son típicamente del isotipo IgG1 o IgG3. Nótese que además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos que median la ADCC pueden generarse modificando una región variable de un anticuerpo que no media la ADCC o un fragmento de región variable formando una región constante del isotipo IgG1 o IgG3.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR de preferencia es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR de preferencia es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye a los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación inmuno receptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición inmuno receptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daeron (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234). Los FcR se recopilan en Ravetch and Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel y col. (1994) Immunomethods 4: 25-34; y de Haas y col. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126: 330-341. Otros FcRs, incluidos los que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col. (1976) J. Immunol. 117: 587 y Kim y col. (1994) J. Immunol. 24: 249 (1994)).

Hay varias maneras de producir anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden immortalizarse células secretoras por medio de la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, las células infectadas con EBV son difíciles de clonar y usualmente producen sólo rendimientos relativamente bajos de inmunoglobulina (James and Bell (1987) J. Immunol Methods 100: 5-40). En el futuro, posiblemente podría lograrse la immortalización de células B humanas mediante la introducción de una combinación definida de genes transformadores. Esa posibilidad se destaca por medio de una reciente demostración de que la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa junto con la oncoproteína grande de SV40 y un alelo oncogénico de H-ras dio como resultado la conversión tumorigénica de células

fibroblásticas y epiteliales humanas normales (Hahn y col. (1999) Nature 400: 464-468). Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas (Jakobovits y col. (1993) Nature 362: 255-258; Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13: 65-93; Fishwild y col. (1996) Nat. Biotechnol. 14: 845-851; Mendez y col. (1997) Nat. Genet. 15: 146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23; Tomizuka y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727; recopilado en Little y col. (2000) Immunol. Today 21: 364-370). Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota de la región de unión de cadenas pesadas (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógenos (Jakobovits y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555). La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulinas humanas de línea germinal en tales ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el desafío con antígenos (Jakobovits y col. (1993) Nature 362: 255-258). Mendez y col. (1997) (Nature Genetics 15: 146-156) han generado una línea de ratones transgénicos que, cuando se desafían con un antígeno, generan anticuerpos totalmente humanos de alta afinidad. Esto se logró por la integración en la línea germinal de loci megabase de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en los ratones con delección en el segmento endógeno JH como se describió anteriormente. Estos ratones (tecnología XenoMouse® II (Abgenix; Fremont, California)) albergan 1.020 kb del locus de cadena pesada humana que contiene aproximadamente 66 genes de VH, regiones DH y JH completas, y tres regiones constantes diferentes, y también albergan 800 kb del locus κ humano que contiene 32 genes de V κ , segmentos J κ y genes de C κ . Los anticuerpos producidos en estos ratones se asemejan mucho a los que se observan en seres humanos en todos los aspectos, incluidos la reorganización genética, la estructura y el repertorio. Los anticuerpos humanos se expresan de preferencia sobre anticuerpos endógenos por delección en el segmento endógeno que evita la reorganización genética en el locus murino. Tales ratones pueden inmunizarse con un antígeno de interés particular.

Los sueros de tales animales inmunizados pueden seleccionarse para reactividad de anticuerpo frente al antígeno inicial. Los linfocitos pueden aislarse de ganglios linfáticos o de células del bazo y además pueden seleccionarse para células B seleccionando las células CD138 negativas y CD19 positivas. En un aspecto, tales cultivos de células B (BCC) pueden fusionarse a células de mieloma para generar hibridomas como se detalló anteriormente.

En otro aspecto, tales cultivos de células B pueden seleccionarse además para reactividad frente al antígeno inicial, de preferencia. Tal selección incluye ELISA con la proteína diana/antígeno, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés, y unión *in vitro* a células CHO u otras células transfectadas de manera transitoria que expresan el antígeno diana.

La presente divulgación se refiere a procedimientos para el tratamiento de sujetos humanos con tumores sólidos que comprende células del carcinoma que expresan CD40 incluyendo, pero sin limitarse a estos, cáncer de ovarios, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de células pequeñas del pulmón), mama, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares) gástrico, de cuello uterino, próstata, nasofaríngeal, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas (incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing). Los procedimientos implican el tratamiento con un anticuerpo anti CD40 descrito en este documento, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, en el que la administración del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno promueve una respuesta terapéutica positiva en el sujeto que se somete a este procedimiento de terapia. Los anticuerpos anti CD40 adecuados para uso en los procedimientos de la invención se unen específicamente al antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula de carcinoma humana y están exentos de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40, como se demuestra para células B humanas normales y neoplásicas que expresan CD40. Estos anticuerpos anti CD40 y sus fragmentos de unión al antígeno se denominan en el presente documento anticuerpos anti CD40 antagonistas. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a estos, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 totalmente humanos que se describen a continuación y los anticuerpos monoclonales que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Estos anticuerpos monoclonales que se pueden producir de forma recombinante se describen a continuación.

Los anticuerpos que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 incluyen anticuerpos que interfieren de manera competitiva con la unión de CHIR-5.9 y CHIR-12.12 a CD40 y/o se unen a los mismos epítomos que CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Un experto podría determinar si un anticuerpo interfiere de manera competitiva con CHIR-5.9 o CHIR-12.12 usando procedimientos convencionales, conocidos en la técnica.

Cuando estos anticuerpos se unen a CD40 expuesto en la superficie de las células que expresan CD40 de un tumor sólido (también denominado en esta invención como células del carcinoma que expresan CD40), los anticuerpos están exentos de actividad agonista importante; en algunas realizaciones, su unión a CD40 expuesto en la superficie de las células de carcinoma que expresan CD40 da lugar a muerte dependiente de ADCC de estas células de carcinoma, y de ahí una reducción en el volumen del tumor. Por consiguiente, los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la invención incluyen los anticuerpos monoclonales que pueden exhibir actividad antagonista hacia las células humanas que expresan el antígeno de superficie celular CD40, como se demuestra para células B humanas normales y neoplásicas que expresan CD40.

Anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 representan anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti CD40 totalmente humanos del isotipo IgG1 producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 12.12). Estas líneas celulares se crearon usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el locus de cadena pesada de IgG1 humana y el locus de cadena κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Las células del bazo se fusionaron con las células de mieloma SP2/0 de ratón (Sierra BioSource). Las hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estables 5.9 y 12.12. Otros anticuerpos de la invención pueden prepararse de manera similar usando ratones transgénicos para loci de inmunoglobulina humana o por otros procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 2 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), SEC ID N° 4 (secuencia completa para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 presentada en SEC ID N° 4, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 153 de SEC ID N° 4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 1 (secuencia codificadora para la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 3 (secuencia codificadora para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 6 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-5.9), SEC ID N° 7 (secuencia completa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9) y SEC ID N° 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 presentada en SEC ID N° 7, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 158 de SEC ID N° 7). Además, los hibridomas que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se han depositado en la ATCC con una denominación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, resulta de preferencia que los anticuerpos anti CD40 adecuados para uso en los procedimientos de esta invención tengan otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 nativos tienen actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpos que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de CHIR-5.9 o CHIR-12.12 que se unen al antígeno a una citotoxina.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, evitan la unión del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular, y desplazan el ligando de CD40 previamente unido, según se determina por ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro por la unión a CD40 pero no con 15B8, el anticuerpo monoclonal anti CD40 descrito en la solicitud internacional PCT n° PCT/US01/30857, publicada como documento WO 02/28904, también titulada “*Human Anti-CD40 Antibodies*”, presentada el 2 de Octubre de 2001 (expediente del agente n° PP 16092.003).

Cuando se prueban *in vitro* los efectos en la proliferación de células B de sujetos humanos normales, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos anti CD40 antagonistas. Además, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen fuerte proliferación de linfocitos humanos de sujetos normales. Estos anticuerpos son capaces de matar las células diana que expresan CD40 (líneas de linfoma y líneas celulares tumorales sólidas) por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión de CHIR-5.9 por el CD40 humano es de 1.2×10^{-8} M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 es de 5×10^{-10} M, según se determina por medio del ensayo Biacore™.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención exhiben una fuerte afinidad de unión de sitio único por el antígeno CD40 de superficie celular. Los anticuerpos monoclonales de la invención exhiben una constante de equilibrio de disociación (K_D) para CD40 de al menos 10^{-5} M, al menos 3×10^{-5} M, de preferencia al menos 10^{-6} M hasta 10^{-7} M, de más preferencia al menos 10^{-8} M hasta aproximadamente 10^{-12} M, medida usando un ensayo convencional tal como Biacore™. El análisis Biacore se conoce en la técnica y se proporcionan detalles en el “BIAapplications handbook”. Los procedimientos descritos en el documento WO 01/27160 pueden usarse para modular la afinidad de unión.

Se entiende por “antígeno CD40”, “antígeno CD40 de superficie celular”, “receptor de CD40” o “CD40” una glicoproteína transmembranaria que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (véase, por ejemplo las Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 4.708.871; Stamenkovic y col. (1989) EMBO 8: 1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36: 33; Barclay y col. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª ed.; Academic Press, San Diego)). Se han identificado dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcripción con cortes y empalmes alternativos de este gen. La primera isoforma (también conocida como la “isoforma larga” o “isoforma 1”) se expresa como un polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEC ID N° 12 (informada primero en GenBank con N° de acceso CAA43045, e identificada como isoforma 1 en GenBank con N° de acceso NP 001241), codificado por SEC ID N° 11 (véase N° de acceso de GenBank X60592 y NM 001250)), que tiene una secuencia señal representada por los

primeros 19 residuos. La segunda isoforma (también conocida como la “isoforma corta” o “isoforma 2”) se expresa como un polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEC ID N° 10 (N° de acceso de GenBank NP 690593), codificado por SEC ID N° 9 (N° de acceso de GenBank NM 152854)), que también tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir, los residuos 1-165 de SEC ID N° 10 y SEC ID N° 12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en SEC ID N° 10) está codificado por una variante de transcripción (SEC ID N° 9) que carece de un segmento codificador, que da lugar a un cambio del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene un extremo C terminal más corto y diferente (residuos 166-203 de SEC ID N° 10) del que está contenido en la isoforma larga de CD40 (extremo C terminal mostrado en los residuos 166-277 de SEC ID N° 12). Para los fines de la presente invención, el término “antígeno CD40”, “antígeno CD40 de superficie celular”, “receptor de CD40” o “CD40” abarca tanto la isoforma corta como la larga de CD40. Los anticuerpos anti CD40 de la presente invención se unen a un epítipo de CD40 humano que se encuentra en la misma situación dentro de la isoforma corta o la isoforma larga de este antígeno de superficie celular como se señala a continuación en el presente documento.

El antígeno CD40 está expuesto en la superficie de una diversidad de tipos celulares, según se describe en otras partes en el presente documento. Por “expuesto en la superficie” y “expresado en la superficie” se entiende que todo o una parte del antígeno CD40 está expuesto al exterior de la célula. El antígeno CD40 expuesto o expresado puede estar total o parcialmente glicosilado.

Por “actividad agonista” se entiende que la sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a la misma que se inicia por el ligando natural del receptor. Por ejemplo, un agonista de CD40 induce, pero no se limita a, cualquiera o todas las siguientes respuestas: proliferación y diferenciación de células B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de células B, cambio de isotipo, regulación ascendente de la expresión en la superficie celular de MHC clase II y CD80/86, y secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-12 y TNF. Por “actividad antagonista” se entiende que la sustancia funciona como un antagonista. Un antagonista de CD40 evita o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas por la unión del receptor de CD40 a un ligando agonista, en particular CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una o más de las respuestas a la unión de agonistas en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferencia 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, de más preferencia 70%, 80%, 85% y de mayor preferencia 90%, 95%, 99% ó 100%. Los procedimientos para medir la especificidad de unión y la actividad de antagonista de anticuerpos anti CD40 y ligandos de CD40 son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos para controlar la secreción de inmunoglobulinas por las células B, ensayos de proliferación de células B, ensayos de proliferación de células B análogos a Banchereau, ensayos de células T ayudantes para la producción de anticuerpos, ensayos de proliferación de células B con coestimulación y ensayos para regulación ascendente de marcadores de activación de células B. Véase, por ejemplo, los ensayos dados a conocer en el documento WO 00/75348 y en la Patente de EEUU N° 6.087.329.

Por actividad antagonista “significativa” se entiende una actividad agonista de al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. De preferencia, la actividad agonista “significativa” es una actividad agonista que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. Por consiguiente, por ejemplo, cuando la respuesta de células B de interés es la proliferación de células B, la actividad agonista “significativa” sería la inducción de un nivel de proliferación de células B que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que el nivel de proliferación de células B inducido por una sustancia neutra o un control negativo. En una realización, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une a CD40 sirve como el control negativo. Una sustancia “exenta de actividad agonista significativa” exhibirá una actividad agonista de no más que aproximadamente 25% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo, de preferencia no más que aproximadamente 20% mayor, 15% mayor, 10% mayor, 5% mayor, 1% mayor, 0.5% mayor, o incluso no más que aproximadamente 0,1% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en un ensayo de una respuesta de células B. Los anticuerpos anti CD40 antagonistas útiles en los procedimientos de la presente invención están exentos de actividad agonista significativa como se señaló anteriormente cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista está exento de actividad agonista significativa en una respuesta de células B. En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista está exento de actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta de células B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos).

Según se utiliza en el presente documento “anticuerpo anti CD40” abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40 de superficie celular, incluidos anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, y sus fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, F_v, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo anti CD40 original. Son de particular interés para los procedimientos de la presente invención los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y Depósito de Patente N° PTA-5543, respectivamen-

te; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7, la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N° y SEC ID N° 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se une al antígeno o los anticuerpos monoclonales anteriores en los puntos anteriores (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano. Los expertos reconocerán que los anticuerpos antagonistas y los fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos adecuados para uso en los procedimientos descritos en este documento incluyen anticuerpos anti-CD40 antagonistas y sus fragmentos de unión al antígeno, que se producen de forma recombinante usando procedimientos bien conocidos en la técnica y descritos en este documento a continuación, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se han producido de forma recombinante.

Producción de anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas para uso en los procedimientos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier procedimiento de producción de anticuerpos conocido por los expertos en la técnica. Por consiguiente, pueden prepararse sueros policlonales por medio de procedimientos convencionales. En general, primero se utiliza una disolución que contiene el antígeno CD40 para inmunizar a un animal adecuado, de preferencia un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos o cabras son de preferencia para la preparación de sueros policlonales por el volumen de suero que puede obtenerse y la disponibilidad de anticuerpos anti conejo y anti cabra marcados.

Pueden prepararse sueros policlonales en un animal transgénico, de preferencia un ratón que lleva loci de inmunoglobulina humana. En una realización de preferencia, se usan células Sf9 que expresan CD40 como el inmunógeno. La inmunización también puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la disolución que contiene el antígeno en disolución salina, de preferencia en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando por vía intravenosa la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). Típicamente es suficiente una dosis de 50-200 μ g/inyección. La inmunización se estimula por lo general 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en disolución salina, de preferencia usando adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, pueden también generarse anticuerpos mediante inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los fines de esta invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen por extracción de sangre de los animales inmunizados en un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguido por la incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 g x durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por extracción de sangre de conejos.

La producción de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) se da a conocer en la Patente de EEUU N° 6.004.552 incorporada a esta invención como referencia. En resumen, se combinaron secuencias que codifican CD40 humano en un baculovirus usando vectores de transferencia. Los plásmidos se cotransfectaron con ADN de baculovirus de tipo silvestre en células Sf9. Las células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante se identificaron y se purificaron como clones.

De preferencia el anticuerpo es monoclonal en la naturaleza. Por “anticuerpo monoclonal” se entiende un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posible mutaciones que se presentan naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. El término no está limitado con respecto a la especie o la fuente del anticuerpo. El término abarca inmunoglobulinas completas, así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico, es decir, el antígeno CD40 de superficie celular en la presente invención. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo ya que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan según la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256: 495, o pueden producirse por los procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628; Marks y col. (1991) J Mol. Biol. 222: 581-597; y en la Patente de EEUU N° 5.514.548.

Por “epítopo” se entiende la parte de la molécula antigénica para la que se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. Los epítomos pueden comprender residuos lineales de aminoácidos (es decir, los residuos en el epítopo están organizados consecutivamente uno después de otro en forma lineal), residuos no lineales (a los que se hace referencia en el presente documento como “epítomos no lineales”; estos epítomos no están organizados de forma consecutiva), o residuos de aminoácidos tanto lineales como no lineales.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de Kohler y col. (1975) Nature 256: 495-496, o una de sus modificaciones. Típicamente, se inmuniza un ratón con una disolución que contiene el antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la disolución que contiene el antígeno en disolución salina, de preferencia en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral. Puede usarse cualquier procedimiento de inmunización conocido en la técnica para obtener anticuerpos monoclonales de la invención. Tras la inmunización del animal, se extirpa el bazo (y de manera opcional, varios ganglios linfáticos grandes) y se separan las células individuales. Las células del bazo pueden seleccionarse aplicando una suspensión de células a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan por aclarado. A continuación se induce la fusión de las células B resultantes, o de todas las células separadas del bazo, con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se plaquean por dilución en serie y se realiza el ensayo de producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). A continuación se cultivan los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal (mAb) seleccionado *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o reactores de fibras huecas), o *in vivo* (como ascitis en ratones).

Cuando los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención deben prepararse utilizando procedimientos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en el presente documento sirven como una fuente de preferencia de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en las células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de recopilación sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col. (1993) Curr. Opin. in Immunol. 5: 256 y Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151. Como alternativa, puede producirse anticuerpo en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se da a conocer en las Patentes de EEUU N° 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas en vectores separados, pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se produce en células CHO usando el sistema de expresión de genes GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetasa como un marcador. Véase también las Patentes de EEUU N° 5.122.464; 5.591.639; 5.658.759; 5.770.359; 5.827.739; 5.879.936; 5.891.693; y 5.981.216.

Los anticuerpos monoclonales contra CD40 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las secciones dedicadas a antígenos de células B en McMichael, ed. (1987; 1989). Leukocyte Typing III and IV (Oxford University Press, Nueva York); Patentes de EEUU N° 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; documento WO 00/63395; documentos de Publicación Internacional N° WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon y col. (1988) J. Immunol. 140: 1425; Valle y col. (1989) Eur. J. Immunol. 19: 1463; Clark y col. (1986) PNAS 83: 4494; Paulie y col. (1989) J. Immunol. 142: 590; Gordon y col. (1987) Eur. J. Immunol. 17: 1535; Jabara y col. (1990) J. Exp. Med. 172: 1861; Zhang y col. (1991) J. Immunol. 146: 1836; Gascan y col. (1991) J. Immunol. 147: 8; Banchereau y col. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3: 8; y Banchereau y col. (1991) Science 251: 70. Son de particular interés para la presente invención los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente.

La expresión “epítopo del antígeno CD40” según se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que es capaz de tener inmunorreactividad con los anticuerpos monoclonales anti CD40 de la presente invención, excluyendo el propio antígeno CD40. Los epítomos del antígeno CD40 pueden comprender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y otras moléculas, pero para los fines de la presente invención son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión al anticuerpo del antígeno CD40), o sus combinaciones. Los miméticos de oligopéptidos adecuados se describen, entre otros, en la solicitud de PCT US 91/04282.

Además, la expresión “anticuerpo anti CD40” según se utiliza en el presente documento abarca anticuerpos quiméricos anti CD40; tales anticuerpos anti CD40 quiméricos para uso en los procedimientos de la invención tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento. Por anticuerpos “quiméricos” se entiende que de más preferencia se obtienen usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden tanto componentes humanos (incluidas especies inmunológicamente “relacionadas”, por ejemplo, chimpancé) como no humanos. Por consiguiente, la región constante del anticuerpo quimérico es de más preferencia sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo natural humano; la región variable

del anticuerpo quimérico de más preferencia se obtiene de una fuente no humana y tiene la especificidad antigénica deseada para el antígeno CD40 de superficie celular. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que pueda usarse para generar anticuerpos contra un antígeno CD40 humano de superficie celular o material que comprenda un antígeno CD40 humano de superficie celular. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no se limitan a, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.; véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 4.816.567, incorporada en la presente divulgación por referencia) y primates no humanos (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.; véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.750.105 y 5.756.096; incorporadas en la presente divulgación por referencia). Según se usa en el presente documento, la frase “inmunológicamente activo” cuando se usa en referencia a anticuerpos anti CD40 quiméricos significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humano.

Los anticuerpos anti CD40 quiméricos y humanizados también están abarcados por el término anticuerpo anti CD40 según se utiliza en el presente documento. Los anticuerpos quiméricos comprenden segmentos de anticuerpos obtenidos de diferentes especies. Rituxan® (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California) es un ejemplo de un anticuerpo quimérico con una región variable murina y una región constante humana.

Por “humanizado” se entienden formas de anticuerpos anti CD40 que contienen una secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulinas no humanas. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que están reemplazados residuos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La expresión “región determinante de complementariedad” se refiere a las secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Véase, por ejemplo, Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Kabat y col. (1991) *U.S. Dept of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242*. La expresión “región constante” se refiere a la parte de la molécula de anticuerpo que confiere funciones de efector. En trabajos anteriores dirigidos a la producción de anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedades humanas, se sustituyeron regiones constantes de ratón por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados del sujeto se obtuvieron de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados aún provocaron una respuesta inmune no deseada y potencialmente peligrosa en seres humanos y hubo pérdida de afinidad. Los anticuerpos anti CD40 humanizados para uso en los procedimientos de la presente invención tienen características de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento.

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeven y col. (1988) *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes CDR o secuencias CDR de roedores o roedores mutantes. Véase también las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. En algunos casos, los residuos dentro de las regiones marco de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, en anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col. (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Por consiguiente, tales anticuerpos “humanizados” pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véase también la Patente de EEUU N° 6.180.370, y la Publicación Internacional WO 01/27160, en los que se dan a conocer anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen mejor afinidad para un antígeno predeterminado.

También están incluidos en el término anticuerpos anti CD40 los anticuerpos anti CD40 xenogénicos o modificados producidos en un huésped mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, caracterizados por loci de inmunoglobulina (Ig) endógena inactivados. En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de las subunidades ligera y pesada de las inmunoglobulinas del huésped se convierten en no funcionales y se sustituyen con los loci análogos de inmunoglobulina humana. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de subunidades ligera o pesada de inmunoglobulina del huésped. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.877.397 y 5.939.598.

De preferencia, los anticuerpos totalmente humanos contra CD40 se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Uno de tales ratones se obtiene usando tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), y se da a conocer en las Patentes de EEUU N° 6.075.181, 6.091.001 y 6.114.598. Para producir los anticuerpos que se dan a conocer en el presente documento, se inmunizaron ratones transgénicos para el locus de cadena pesada de IgG₁ humana y el locus

de cadena ligera κ humana con células Sf9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos totalmente humanos útiles en los procedimientos de la presente invención se caracterizan por tener propiedades de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento.

5

Los fragmentos de los anticuerpos anti CD40 son adecuados para uso en los procedimientos de la invención siempre que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud total. Por consiguiente, un fragmento de un anticuerpo anti CD40 retendrá la capacidad para unirse al antígeno CD40 de superficie de las células B. Tales fragmentos se caracterizan por tener propiedades similares al anticuerpo anti CD40 antagonista de longitud total correspondiente, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. En el presente documento se hace referencia a estos fragmentos como fragmentos “que se unen al antígeno”. Los fragmentos de un anticuerpo que se unen al antígeno adecuados comprenden una parte de un anticuerpo de longitud total, por lo general la región de unión al antígeno o una de sus regiones variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv y moléculas de anticuerpos de cadena simple. Por “Fab” se entiende un fragmento monovalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que está compuesto por la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Por F(ab')₂ se entiende un fragmento bivalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Por “Fv de cadena simple” o fragmentos “sFv” del anticuerpo se entiende fragmentos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Por lo general, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315. Los fragmentos de los anticuerpos anti CD40 antagonistas que se unen al antígeno dados a conocer en el presente documento también pueden conjugarse a una citotoxina para producir la lisis de las células cancerosas diana, como se describe a continuación en el presente documento.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) *Nature* 348: 552-554 (1990) y en la Patente de EEUU N° 5.514.548. Clackson y col. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden de nM) por mezcla aleatoria de cadenas (Marks y col. (1992) *Biol/Technology* 10:779-783), así como por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2265-2266). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan y col. (1985) *Science* 229: 81). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por medio de células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de la biblioteca de anticuerpos de fagos analizada anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col. (1992) *Bio/Technology* 10: 163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otra técnica para la producción de fragmentos de anticuerpos resultará evidente para el experto en la técnica.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR 12.12 dados a conocer en el presente documento así como los anticuerpos que difieren de estos anticuerpos pero que retienen las CDR; y los anticuerpos con una o más adición(es), delección(es) o sustitución(es), en los que la actividad antagonista se mide por inhibición de la proliferación y/o diferenciación de las células B. La invención también abarca los anticuerpos anti CD40 antagonistas desimmunizados, que pueden producirse como se describe en, por ejemplo, los documentos de Publicación Internacional N° WO 98/52976 y WO 0034317. De esta manera, los residuos dentro de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención se modifican para convertir a los anticuerpos en no inmunogénicos o menos inmunogénicos para los seres humanos manteniendo al mismo tiempo su actividad antagonista hacia las células humanas que expresan CD40, en los que tal actividad se mide por medio de los ensayos señalados en otra parte en el presente documento. También se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención, o uno de sus fragmentos, cuyas proteínas de fusión pueden sintetizarse o expresarse a partir de vectores de polinucleótidos correspondientes, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con referencia a la conjugación de anticuerpos como se señala a continuación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden tener variaciones de secuencia producidas usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, los documentos de Publicación de Patente N° EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden provocar que un anticuerpo se una a MAC Clase II y desencadenar una respuesta de células T ayudantes no deseada. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión y aún pierda su capacidad para desencadenar una res-

puesta de células T no deseada. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras puede realizarse usando procedimientos reconocidos en la técnica, tales como los señalados en otra parte en el presente documento, y los anticuerpos resultantes se encontrarán dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos variantes pueden probarse de manera rutinaria para verificar su actividad antagonista, afinidad y especificidad usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Un anticuerpo producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no dado a conocer en el presente documento, se encontrará dentro del alcance de esta descripción si posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares intra apoptóticas de “supervivencia” en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida; inhibición de transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B neoplásicas humanas como se señala a continuación. Estos ensayos pueden realizarse como se describe en Schultze y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200-8204; Denton y col. (1998) Pediatr. transplant. 2: 6-15; Evans y col. (2000) J. Immunol. 164: 688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17-22; Lederman y col. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77-86; Coligan y col. (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12; Kwekkeboom y col. (1993) Immunology 79: 439-444; y Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 5.847.082.

Un ensayo representativo para detectar anticuerpos anti CD40 antagonistas específicos para los epítomos del antígeno CD40 identificado en el presente documento es un “ensayo de unión competitiva”. Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que el desconocido se detecta y cuantifica por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, se precipita el polipéptido CD40 marcado por medio de anticuerpos candidato en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales surgidos contra uno o más epítomos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti CD40 que reaccionan específicamente con un epítomo de interés pueden identificarse seleccionando una serie de anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o fragmento de la proteína que comprende el epítomo particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para CD40 humano, los epítomos de interés incluyen epítomos que comprenden residuos de aminoácido lineales o no lineales de la isoforma corta del CD40 humano (véase GenBank N° de acceso NP 690593) presentada en la Figura 4B (SEC ID N° 10), codificada por la secuencia presentada en la Figura 4A (SEC ID N° 9; véase también GenBank N° de acceso M 152854), o de la isoforma larga de CD40 humano (véase GenBank N° de acceso CAA43045 y NP 001241) presentada en la Figura 4D (SEC ID N° 12), codificada por la secuencia presentada en la Figura 4C (SEC ID N° 11; véase GenBank N° de acceso X60592 y MN 001250). Como alternativa, podrían usarse ensayos de unión competitiva con anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados identificados anteriormente para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados anteriormente.

Los anticuerpos utilizados en tales inmunoensayos pueden estar marcados o no marcados. Los anticuerpos no marcados pueden utilizarse en aglutinación; los anticuerpos marcados pueden utilizarse en una amplia diversidad de ensayos, usando una amplia diversidad de marcadores. La detección de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo entre un anticuerpo anti CD40 y un epítomo de interés puede facilitarse fijando una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, complejos enzima sustrato o cofactores, inhibidores de enzimas, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material fluorescente es el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivos adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . Tales reactivos marcados pueden utilizarse en una diversidad de ensayos conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA inmunoensayos fluorescentes y similares. Véase, por ejemplo, Patentes de EEUU N° 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; y 4.233.402.

Cualquiera de los anticuerpos anti CD40 antagonistas o sus fragmentos de anticuerpos descritos previamente pueden conjugarse antes del uso en los procedimientos de la presente invención. Los procedimientos para producir anticuerpos conjugados son conocidos en la técnica. Por consiguiente, el anticuerpo anti CD40 puede marcarse usando una marcación indirecta o un enfoque de marcación indirecta. Por “marcación indirecta” o “enfoque de marcación indirecta” se entiende que un agente quelante se une covalentemente a un anticuerpo y se inserta al menos un radionúclido en el agente quelante. Véase, por ejemplo, los agentes quelantes y radionúclidos descritos en Srivagava and Mease (1991) Nucl. Med. Bio. 18: 589-603, incorporado a esta invención como referencia. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (especialmente ^{32}P y ^{125}I), reactivos densos a electrones, enzimas y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa del rábano picante se detecta usualmente mediante su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. “Pareja de unión específica” se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para éste. Otras parejas de unión específica incluyen biotina

y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar los diversos marcadores en diferentes clases, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede servir como un marcador radioactivo o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversos marcadores para el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y la avidina también requieren marcadores en la práctica de esta invención: por consiguiente, puede marcarse un mAb con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con un mAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Como alternativa, el anticuerpo anti CD40 puede marcarse usando “marcación directa” o un “enfoque de marcación directa”, en el que un radionúclido se fija covalentemente a un anticuerpo (típicamente a través de un residuo de aminoácido). Los radionúclidos de preferencia se proporcionan en Srivastava and Mease (1991) *supra*. El enfoque de marcación indirecta es particularmente de preferencia. Véase también, por ejemplo, los documentos de Publicación Internacional N° WO 00/52031 y WO 00/52473, en los que se usa un conector para fijar el marcador radiactivo a los anticuerpos; y las formas marcadas de anticuerpos anti CD40 descritas en la Patente de EEUU N° 6.015.542.

Además, un anticuerpo (o su fragmento) puede conjugarse a un resto terapéutico como una citotoxina, un agente terapéutico, iones metálicos radiactivos o radioisótopos. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y sus análogos y homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada; no debe entenderse que el resto del fármaco esté limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que tenga una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador tisular del plasminógeno, o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 (“IL-1”), interleucina 2 (“IL-2”), interleucina-6 (“IL-6”), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (“GM-CSF”), factor estimulador de colonias de granulocitos (“G-CSF”) u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Amon y col. (1985) “Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld y col. (Alan R. Liss, Inc.), páginas 243-256; ed. Hellstrom y col. (1987) “Antibodies for Drug Delivery,” en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson y col. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), páginas 623-653; Thorpe (1985) “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review”, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera y col. páginas 475-506 (Editrice Kurtis, Milán, Italia, 1985); “Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin y col. (Academic Press, Nueva York, 1985), páginas 303-316; y Thorpe y col. (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-158.

Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe en la Patente de EEUU N° 4.676.980. Además, pueden utilizarse conectores entre los marcadores y los anticuerpos de la invención (véase Patente de EEUU N° 4.831.175). Los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno pueden marcarse directamente con yodo, indio, itrio radiactivos o con otras partículas radiactivas conocidas en la técnica (Patente de EEUU N° 5.595.721). El tratamiento puede estar constituido por una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados en forma simultánea o consecutiva (documentos WO 00/52031 y WO 00/52473).

Variantes de anticuerpos anti CD40 antagonistas

En los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse variantes de los anticuerpos anti CD40 antagonistas biológicamente activas adecuadas. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti CD40 antagonista original. Por lo general, en la técnica están disponibles procedimientos para producir variantes de anticuerpos.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, por medio de mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los procedimientos para mutagénesis

y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker and Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de EEUU N° 4.873.192; y las referencias citadas en la misma. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés. Las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser de preferencia. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln y Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

En la construcción de variantes del polipéptido de interés del anticuerpo anti CD40 antagonista, las modificaciones se realizan de manera tal que las variantes sigan teniendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y sean capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y estén exentas de actividad agonista significativa pero que exhiban actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica la variante polipéptido no deben colocar a la secuencia fuera del marco de lectura y de preferencia no creará regiones complementarias que podrían producir estructura de ARNm secundaria. Véase Publicación de Solicitud de Patente EP N° 75.444.

Además, la región constante de un anticuerpo anti CD40 antagonista puede mutarse para alterar la función efectora en una serie de formas. Por ejemplo, véase la Patente de EEUU N° 6.737.056B1 y la Publicación de Solicitud de Patente N° 2004/0132101A1, que dan a conocer mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a los receptores de Fc.

De preferencia, las variantes de un anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% o 75% de homología de secuencia, de preferencia al menos 80% u 85% de homología de secuencia, de más preferencia al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ó 95% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, o con una parte más corta de una molécula de anticuerpo de referencia. De más preferencia, las moléculas comparten al menos 96%, 97%, 98% ó 99% de homología de secuencia. Para los fines de la presente invención, el porcentaje de homología de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia en tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Con respecto a la alineación óptima de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y puede tener 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Pueden hacerse correcciones para homología de secuencia asociadas con huecos o sustituciones conservadoras de residuos (véase el algoritmo de búsqueda de Smith-Waterman).

La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y que retiene la actividad antagonista, en particular cuando se une al antígeno CD40 en células B malignas o células que expresan CD40 de un tumor sólido, depende de una serie de factores. Como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas las preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas están incluidas en la definición de anticuerpos anti CD40 antagonistas en el presente documento. Además, puede aumentarse la secuencia de aminoácidos principal del polipéptido por derivatización con restos de azúcar (glicosilación) o por otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se realizan a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras de tales modificaciones pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones están incluidas en la definición de un anticuerpo anti CD40 usada en el presente documento siempre que no se destruyan las propiedades de antagonista del anticuerpo anti CD40. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativamente o cualitativamente la actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse residuos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no retiran a la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti CD40 de interés según se utiliza en el presente documento.

La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y al uso de las variantes de polipéptidos. En la preparación de las variantes de anticuerpos anti CD40, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que sea adecuada para uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los procedimientos dados de la presente invención.

Procedimientos de terapia usando los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención

Los procedimientos de la divulgación están dirigidos al uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas para tratar sujetos (es decir, pacientes) que tienen tumores sólidos que comprenden células que expresan el antígeno de superficie celular CD40. Por “células del carcinoma que expresan CD40” se entiende células malignas (por ejemplo, neoplásticas) o pre-malignas (por ejemplo, neoplásticas) de un tumor sólido que expresa el antígeno de superficie celular CD40. Los procedimientos para detectar la expresión de CD40 en células son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western, ELISA y similares. Tumores sólidos que se pueden tratar usando los procedimientos de la presente descripción incluyen, pero sin limitarse a estos, cáncer de ovarios, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de células pequeñas del pulmón), mama, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares) gástrico, de cuello uterino, próstata, nasofaríngeal, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas (incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing).

En el presente documento se define “tratamiento” como la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno a un paciente, o la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, en el que el sujeto tiene un tumor sólido, un síntoma asociado con un tumor sólido, o una predisposición hacia el desarrollo de un tumor sólido, siendo el objetivo curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar el tumor sólido, cualquier síntoma asociado al tumor sólido o la predisposición al desarrollo del tumor sólido. Por “tratamiento” también se entiende la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o sus fragmentos a un sujeto, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti CD40 o sus fragmentos a un tejido aislado o una línea celular de un sujeto, que tiene un tumor sólido, un síntoma asociado con un tumor sólido o una predisposición al desarrollo del tumor sólido, siendo el objetivo curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar el tumor sólido, los síntomas del tumor sólido o la predisposición al desarrollo del tumor sólido.

Se entiende por “actividad antitumoral” una reducción en la tasa de proliferación o acumulación de células malignas que expresan CD40, y por consiguiente un descenso en la tasa de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásticas (tumor) existentes o células neoplásticas formadas nuevas, y por consiguiente un descenso en el tamaño global de un tumor durante la terapia. La terapia con al menos un anticuerpo anti CD40 (o su fragmento de unión al antígeno) provoca una respuesta fisiológica que es ventajosa con respecto al tratamiento de tumores sólidos en un humano, donde los tumores sólidos comprenden células de carcinoma que expresan CD40. Se reconoce que los procedimientos de la descripción pueden ser útiles en la prevención de otras consecuencias tumorales que surjan durante la terapia.

De conformidad con los procedimientos de la presente divulgación, al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión al antígeno) tal como se define en otras partes en el presente documento se utiliza para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a un tumor sólido. Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento del cáncer se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antitumoral de estos anticuerpos o sus fragmentos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, prevención de otras consecuencias del tumor, una reducción del tamaño del tumor, una reducción en la cantidad de células cancerosas y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de las células que expresan CD40. Por consiguiente, por ejemplo, una mejora de la enfermedad puede ser caracterizada como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico, de médula ósea y de líquido cefalorraquídeo (LCR), previamente anormal. Tal respuesta debe persistir durante al menos un mes después del tratamiento según los procedimientos de la descripción. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se entiende una disminución de al menos el 50% en todas las cargas tumorales que pueden medirse (es decir, la cantidad de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y que persiste durante al menos un mes. Tal respuesta es aplicable sólo a los tumores que pueden medirse.

La respuesta del tumor puede evaluarse para cambios en la morfología del tumor (es decir, carga general del tumor, tamaño del tumor y similares) utilizando técnicas de detección tales como la exploración de imágenes de resonancia magnética (RM), imágenes de rayos x, exploración por tomografía computerizada (TC), imágenes bioluminiscentes, por ejemplo, imágenes con luciferasa, imágenes de gammagrafía ósea y recogida de muestras de biopsias de tumor incluyendo la aspiración de médula ósea (AMO). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede experimentar el efecto ventajoso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se entiende una cantidad de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al anticuerpo que, cuando se administra da lugar a una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que comprende la estimulación de las células que expresan CD40. En algunas realizaciones de la invención, una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 o su fragmento está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg

hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el procedimiento de tratamiento puede comprender una única administración de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

Otra realización de la divulgación es el uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas para el control de diagnóstico de los niveles proteicos en el tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa del rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficeotrina; un ejemplo de un material fluorescente incluye el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con al menos otra terapia contra cáncer, incluyendo pero sin limitarse a estas, cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia con citocina, u otro anticuerpo monoclonal que se pretenda para uso en el tratamiento del tumor sólido de interés, en las que la terapia anticancerosa adicional se administra antes de, durante, o posteriormente a la terapia con el anticuerpo anti CD40. Por consiguiente, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia con citocina, u otro anticuerpo monoclonal, los procedimientos de la divulgación abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas de una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades terapéuticas. Cuando los procedimientos de la presente descripción comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias pueden darse de manera simultánea, es decir, el anticuerpo anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno se administra simultáneamente o dentro del mismo período de tiempo que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias tienen lugar simultáneamente, pero el anticuerpo anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno no se administra precisamente en el mismo momento que la otra terapia contra el cáncer). Como alternativa, el anticuerpo anti CD40 de la presente invención o su fragmento de unión al antígeno puede también administrarse antes de, o posteriormente a la otra terapia contra el cáncer. La administración secuencial de las diferentes terapias contra el cáncer puede realizarse independientemente de que el sujeto tratado responda al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída.

En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti CD40 descritos en este documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con quimioterapia o terapia con citocina, pudiéndose administrar el anticuerpo y el(los) agente(s) quimioterapéutico(s) o citocina(s) secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de manera simultánea o dentro del mismo periodo de tiempo). Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero sin limitarse a estos, CPT-11 (irinotecano), que se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer colorrectal y cáncer de células no pequeñas del pulmón; gemcitabina, que se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer epitelial de ovarios; y otros agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento de tumores sólidos. Citocinas de interés incluyen, pero sin limitarse a estas, alfa-interferona, gamma-interferona, interleuquina-2 (IL-2), IL-12, IL-15 e IL-21, factor de estimulación de colonia de macrófago granulocito (GM-CSF), factor de estimulación de colonia de granulocito (G-CSF) o variantes biológicamente activas de estas citocinas.

En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos anti CD40 descritos en este documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con otros anticuerpos monoclonales dirigidos al tratamiento del tumor sólido. Por consiguiente, por ejemplo, cuando el sujeto está sometido a tratamiento de un cáncer de mama que comprende células del carcinoma que expresan CD40, la terapia podría incluir administración de cantidades efectivas de un anticuerpo anti-CD40 antagonista descrito en este documento, o su fragmento de unión al antígeno, en combinación con administración de cantidades efectivas de Herceptin® (Genentech, Inc., San Francisco, California), que se dirige a la proteína receptora Her2 en células de cáncer de mama Her2+. De forma similar, cuando el sujeto está sometido a tratamiento de cáncer colorrectal que comprende células del carcinoma que expresan CD40, la terapia podría incluir administración de cantidades efectivas de un anticuerpo anti-CD40 antagonista descrito en este documento, o su fragmento de unión al antígeno, en combinación con administración de cantidades efectivas de anticuerpo monoclonal humanizado Avastin™ (también conocido como bevacizumab; Genentech, Inc., San Francisco, California), que se une e inhibe el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína que juega un papel crítico en la angiogénesis del tumor. Otros ejemplos de anticuerpos monoclonales dirigidos al tratamiento de tumores sólidos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a estos, anticuerpo anti-EGFR que se dirigen al receptor del factor del crecimiento epidérmico (por ejemplo, IMC-C225 (ImClone Systems, Nueva York, Nueva York) (véase, por ejemplo, Mendelsohn and Baselga (2000) Oncogene 19:

6550-6565 and Solbach y col. (2002) Int. J. Cancer 101: 390-394); anticuerpo del receptor anti-IGF-1, que se dirige a la proteína del receptor IGF-1 (véase, por ejemplo, Maloney y col. (2003) Cancer Res. 63: 5073-5083 and Hailey y col. (2002) Mol. Cancer. Plier. 1: 1349-1353; anticuerpo anti-MUC1, que se dirige a la antígeno MUC1 asociado al tumor; anti- $\alpha 5\beta 1$, anti- $\alpha v\beta 5$, y anti- $\alpha v\beta 3$, que se dirige a aquellas integrinas respectivas, que regulan la adhesión celular y procesos de señalización implicados en la proliferación y supervivencia celular (véase, por ejemplo, Laidler y col. (2000) Acta Biochimica Polonica 47 (4): 1159-1170 and Cruet-Hennequart y col. (2003) Oncogene 22 (11): 1688-1702); anticuerpo anti-P-cadherina, que se dirige a este miembro de la familia de la cadherina (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU en tramitación junto con la presente 20030194406); y anticuerpo anti-VE-cadherina, que se dirige a la función relacionada angiogénica de esta molécula de adhesión específica de la célula del endotelio (véase, por ejemplo, Liao y col. (2002) Cancer Res. 62: 2567-2575).

Los anticuerpos anti-CD40 de la invención y el otro anticuerpo monoclonal se pueden administrar secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de forma simultánea o dentro del mismo periodo de tiempo). Cuando se administra más de un tipo de anticuerpo monoclonal, los procedimientos de la presente invención pueden comprender adicionalmente la exposición a radiación y/o quimioterapia como se especifique para el tratamiento contra el cáncer y como se recomienda por el facultativo médico responsable.

Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

Los anticuerpos anti CD40 para uso en los procedimientos de la presente invención se administran en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar tumores sólidos que comprenden células del carcinoma que expresan CD40, incluyendo cáncer de ovarios, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de células pequeñas del pulmón), mama, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares) gástrico, de cuello uterino, próstata, nasofaríngeal, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas (incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing). Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse usando una diversidad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se administran por medio de inyección, ya sea por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. Los procedimientos para llevar a cabo esta administración son conocidos por los expertos en la técnica. También es posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas.

La administración intravenosa se realiza de preferencia por medio de infusión durante un periodo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 horas, de más preferencia durante aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 horas, de más preferencia aún durante aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7 horas, todavía de más preferencia durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo anti CD40 que se administra. La infusión inicial con la composición farmacéutica puede administrarse durante un periodo de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas con infusiones posteriores administradas de manera más rápida. Las infusiones posteriores pueden administrarse durante un periodo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 horas, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 horas, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 horas.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), intraperitoneal, intratumoral o la infusión), oral y pulmonar (por ejemplo, inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicaciones parenterales, intradérmicas o subcutáneas pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o de plástico.

Los anticuerpos anti CD40 se proporcionan típicamente por medio de técnicas convencionales en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, disolución salina estéril, agua tamponada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. En Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990) se describen procedimientos para preparar agentes que pueden administrarse por vía parenteral.

Véase también, por ejemplo, el documento WO 98/56418, que describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizadas adecuadas para usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación la cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento a administrar dada la descripción del presente documento. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento) incluyen, pero se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que se somete al tratamiento. De manera similar, la cantidad de

anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una monodosis o a dosis múltiples de este agente antitumoral. Por lo general, al aumentar el peso del sujeto sometido al tratamiento, resulta de preferencia una dosis más alta del anticuerpo anti CD40 o su fragmento. La dosis del anticuerpo anti CD40 o su fragmento a administrar está en el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, de preferencia en el intervalo de 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis puede ser de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 50 mg/kg.

En otra realización de la descripción, el procedimiento comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. El procedimiento puede comprender la administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más dosis terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. La frecuencia y duración de administración de las dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo anti CD40 o su fragmento pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación dada la descripción del presente documento. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo de preferencia, se trata al sujeto con anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, de preferencia aproximadamente entre 2 y 8 semanas, de más preferencia aproximadamente entre 3 y 7 semanas, y aún de más preferencia durante aproximadamente 4, 5, ó 6 semanas. El tratamiento puede llevarse a cabo anualmente para prevenir la recaída o tras la indicación de la recaída. También se apreciará que la dosis eficaz de anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden ser el resultado y pueden resultar evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento. Por consiguiente, en una forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 7, 14 y 21 de un período de tratamiento. En otra forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de una semana en un período de tratamiento. Otras formas de realización incluyen un régimen de dosificación que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 3, 5 y 7 de una semana en un período de tratamiento; un régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1 y 3 de una semana en un período de tratamiento; y un régimen de dosificación de preferencia que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en el día 1 de una semana en un período de tratamiento. El período de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año. Los períodos de tratamiento pueden ser consecutivos o pueden estar separados uno de otro por un día, una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno varía desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis de cualquier anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o su fragmento de unión al antígeno, puede ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otra dosis semejante que esté dentro el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. La misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede administrarse a lo largo de cada semana de dosificación del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno durante el transcurso de un período de tratamiento.

En otras realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg) con dosis posteriores dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg).

En realizaciones alternativas, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg) con dosis posteriores dentro del intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg). Por consiguiente, en una forma de realización, la dosis terapéuticamente eficaz inicial del anticuerpo anti CD40 an-

tagonista o su fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 35 mg/kg, incluyendo aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, y las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno son de aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo aproximadamente 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg.

En algunas realizaciones de la divulgación, la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista se inicia administrando una “dosis de carga” del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno al sujeto que necesita terapia con anticuerpos anti CD40 antagonistas. Por “dosis de carga” se entiende una dosis inicial del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno que se administra al sujeto, en la que la dosis del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno administrado está dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg). La “dosis de carga” puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una infusión única en la que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en las que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, siempre que la “dosis de carga” completa se administre en un período de aproximadamente 24 horas. Tras la administración de la “dosis de carga”, se administra a continuación una o más dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno al sujeto. Pueden administrarse dosis terapéuticamente eficaces posteriores, por ejemplo, según un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En tales formas de realización, las dosis terapéuticamente eficaces posteriores generalmente están en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg).

Como alternativa, en algunas formas de realización, tras la “dosis de carga”, las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administran según un “programa de mantenimiento”, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada dos meses, una vez cada 10 semanas, una vez cada tres meses, una vez cada 14 semanas, una vez cada cuatro meses, una vez cada 18 semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada 22 semanas, una vez cada seis meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses, o una vez cada 12 meses. En tales formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno está en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos más frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas hasta una vez al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos menos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis posteriores se administran separadas por aproximadamente un mes hasta aproximadamente 12 meses.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas presentes en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para usar en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser nativos o pueden obtenerse por medio de técnicas recombinantes y pueden ser de cualquier fuente, incluidas las fuentes de mamíferos tales como, por ejemplo, ratón, rata, conejo, primate, cerdo y ser humano. De preferencia tales polipéptidos se obtienen de una fuente humana, y de más preferencia son proteínas humanas, recombinantes de líneas celulares de hibridoma.

Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden comprender variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención. Tales variantes deben retener la actividad biológica deseada del polipéptido nativo tal que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tenga el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el anticuerpo anti CD40 variante servirá como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de manera similar a la observada para el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo CHIR-5.9 o CHIR-12.12 como se expresa por la línea celular de hibridoma 5.9 ó 12.12, respectivamente. En la técnica están disponibles procedimientos para determinar si un anticuerpo anti CD40 variante retiene la actividad biológica deseada, y sirve por consiguiente como un componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes del anticuerpo puede medirse usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del anticuerpo antagonista nativo, incluidos los ensayos descritos en la presente invención.

Cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti CD40 antagonista que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento como el componente terapéuticamente activo puede usarse en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden uno o más de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención pueden prepararse como una disolución o suspensión acuosa o no acuosa para la posterior administración a un sujeto de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos uno de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la presente invención como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por “componente terapéuticamente o profilácticamente activo” se entiende que el anticuerpo anti CD40 está específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de un tumor sólido en un sujeto cuando se administra la composición farmacéutica a ese sujeto. De preferencia la composición farmacéutica comprende agentes estabilizantes, agentes de carga adecuados, o ambos para reducir al mínimo los problemas asociados con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de las proteínas durante la preparación y el almacenamiento.

Pueden añadirse compuestos de formulación a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención. Estos compuestos de formulación pueden incluir, pero no se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. Los hidratos de carbono de preferencia incluyen azúcares o alcoholes de azúcar tales como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua. Los sacáridos o glucanos pueden incluir fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sucrosa, dextrano, pullulano, dextrina, ciclodextrina α y β , almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa, o sus mezclas. Se define "alcohol de azúcar" como un hidrocarburo C_4 a C_8 que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol y arabitól. Estos azúcares o alcoholes de azúcar pueden usarse de manera individual o en combinación. La concentración del azúcar o de alcohol de azúcar está entre 1,0% y 7% p/v., de más preferencia entre 2,0% y 6,0% p/v. Los aminoácidos de preferencia incluyen formas levóginas (L) de carnitina, arginina, y betaína; sin embargo, pueden añadirse otros aminoácidos. De preferencia los polímeros incluyen polivinilpirrolidona (PVP) con un peso molecular promedio entre 2.000 y 3.000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio entre 3.000 y 5.000. Los tensioactivos que pueden añadirse a la formulación se muestran en los documentos EP N° 270.799 y 268.110.

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida de circulación. Los polímeros de preferencia y los procedimientos para ligarlos a péptidos, se muestran en las Patentes de EEUU N° 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546. Los polímeros de preferencia son polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_n O-R$ donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. De preferencia, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, de más preferencia es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, de preferencia entre 1 y 1.000, de más preferencia entre 2 y 500. El PEG tiene de preferencia un peso molecular promedio entre 1.000 y 40.000, de más preferencia entre 2.000 y 20.000, de mayor preferencia entre 3.000 y 12.000. De preferencia, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, de más preferencia es un grupo hidroxilo terminal. Este es el grupo hidroxilo que se activa de preferencia para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos pueden variarse para obtener un PEG/anticuerpo de la presente invención conjugado de manera covalente.

Los polioles polioxiethylados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Estos incluyen sorbitol polioxiethylado, glucosa polioxiethylada, glicerol polioxiethylado (POG), y otros. Resulta de preferencia el POG. Una razón es porque la estructura central glicerol del glicerol polioxiethylado es la misma estructura central que se presenta en la naturaleza en, por ejemplo, animales y seres humanos en los mono-, di-, triglicéridos. Por consiguiente, esta ramificación no será considerada necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular de preferencia en el mismo intervalo que PEG. La estructura para el POG se muestra en Knauf y col. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, y puede encontrarse un análisis de conjugados POG/IL-2 en la Patente de EEUU N° 4.766.106.

Otro sistema de administración de fármacos para aumentar la semivida circulatoria es el liposoma. Los procedimientos para preparar los sistemas de administración de liposomas se analizan en Gabizon y col. (1982) Cancer Research 42:4734; Cañiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. En la técnica se conocen otros sistemas de administración de fármacos y están descritos, por ejemplo, en Poznansky y col. (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) páginas 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

Los compuestos de formulación a incorporar en una composición farmacéutica deberían proporcionar estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. Es decir, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno deberá retener su estabilidad física y/o química y deberá tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades definidas anteriormente en el presente documento, incluidas, pero no limitadas a, inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T de Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida; inhibición de la transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B humanas malignas como se señaló en otra parte en el presente documento.

Los procedimientos para controlar la estabilidad de las proteínas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jones (1993) Adv Drug Delivery Rev. 10:29-90; Lee, ed. (1991) Peptide y Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York); y los ensayos de estabilidad que se dan a conocer en el presente documento a continuación. En general, la estabilidad de las proteínas se mide a una temperatura elegida durante un período de tiempo especificado. En realizaciones de preferencia, una formulación farmacéutica de anticuerpo estable proporciona estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno cuando se almacena a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante al menos 1 mes, al menos 3 meses, o al menos 6 meses, y/o es estable aproximadamente a 2-8°C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses.

Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad física en un momento dado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de transparencia) o signos que pueden medirse (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad química en un momento dado si las medidas de estabilidad química son indicativas de que la proteína (es decir, el anticuerpo) mantiene su actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los procedimientos para controlar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tales como el resultado la degradación, usando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida por matriz; y degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con desamidación), usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, los procedimientos que se dan a conocer en el presente documento a continuación.

Se considera que un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, cuando se formula en una composición farmacéutica, mantiene una actividad biológica deseada en un momento dado si la actividad biológica deseada en ese momento está aproximadamente dentro del 30%, de preferencia aproximadamente dentro del 20% de la actividad biológica deseada exhibida en el momento en que se preparó la composición farmacéutica según se determina en un ensayo adecuado para la actividad biológica deseada. Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento, y sus fragmentos que se unen al antígeno, pueden llevarse a cabo como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Véase también los ensayos descritos en Schultze y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton y col. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans y col. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman y col. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan y col. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom y col. (1993) *Immunology* 79:439-444; y las Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 5.847.082.

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos los procedimientos dados a conocer anteriormente en el presente documento. En una forma de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se produce de manera recombinante en una línea celular CHO.

Tras su preparación y purificación, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede formularse como una formulación farmacéutica líquida de la manera expuesta en el presente documento. Cuando el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno debe almacenarse antes de su formulación, pueden congelarse, por ejemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, y a continuación descongelarse a temperatura ambiente para otra formulación. La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. La cantidad de anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno presente en la formulación tiene en consideración la vía de administración y el volumen de dosis deseado.

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, o aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 5,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 10,0 mg/ml, aproximadamente 10,0 mg/ml hasta aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 25,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 30,0 mg/ml hasta aproximadamente 35,0 mg/ml, aproximadamente 35,0 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 40,0 mg/ml hasta aproximadamente 45,0 mg/ml, o aproximadamente 45,0 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml. En otras formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 16,0 mg/ml, aproximadamente 17,0 mg/ml, aproximadamente 18,0 mg/ml, aproximadamente 19,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 21,0 mg/ml, aproximadamente 22,0 mg/ml, aproximadamente 23,0 mg/ml, aproximadamente 24,0 mg/ml, o aproximadamente 25,0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, incluyendo aproximadamente pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0. En algunas formas de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

En la formulación puede usarse cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida del anticuerpo anti CD40 en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, siempre que la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se mantengan como se señaló anteriormente en el presente documento. Los tampones incluyen pero no se limitan a, ácidos convencionales y sus sales, donde el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Los ejemplos de ácidos convencionales y su sales que pueden usarse para tamponar la formulación farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, tampones de ácido succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maleico o maleato y ácido málico o malato. La concentración del tampón en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración del tampón en la formulación es desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM.

En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR 12,12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y tampón succinato o tampón citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, de preferencia aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5. Por “tampón succinato” o “tampón citrato” se entiende un tampón que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una realización de preferencia, el contraión de succinato o citrato es el catión sodio, por consiguiente el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea eficaz cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o de citrato incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se señaló anteriormente, la concentración del tampón succinato o citrato en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tampón en la formulación va desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o aproximadamente 15 mM. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, y tampón succinato o citrato, por ejemplo, tampón succinato de sodio o citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, de preferencia aproximadamente 10 mM.

Cuando sea deseable que la formulación farmacéutica líquida sea prácticamente isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 puede comprender además una cantidad de un agente de isotonicidad suficiente para hacer que la formulación sea prácticamente isotónica. Por “prácticamente isotónica” se entiende que la formulación acuosa tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg hasta aproximadamente 360 mmol/kg, de preferencia aproximadamente 240 hasta aproximadamente 340 mmol/kg, de más preferencia aproximadamente 250 hasta aproximadamente 330 mmol/kg, aún de más preferencia aproximadamente 260 hasta aproximadamente 320 mmol/kg, de mayor preferencia aún aproximadamente 270 hasta aproximadamente 310 mmol/kg. Los procedimientos para determinar la isotonicidad de una disolución son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Setnikar y col. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Los expertos en la técnica están familiarizados con una diversidad de solutos farmacéuticamente aceptable útiles para proporcionar isotonicidad en las composiciones farmacéuticas. El agente de isotonicidad puede ser cualquier reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente invención hasta un valor prácticamente igual al de un líquido corporal. Es deseable utilizar un agente de isotonicidad fisiológicamente aceptable. Por consiguiente, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, puede comprender además componentes que pueden usarse para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluidos, pero no limitados a, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol, y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos y sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. El experto en la técnica conocerá otros agentes que son adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

En algunas realizaciones de preferencia, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de

aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 comprende además cloruro de sodio como el agente de isotonicidad. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 250 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 170 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 160 mM, aproximadamente 135 mM hasta aproximadamente 155 mM, aproximadamente 140 mM hasta aproximadamente 155 mM, o aproximadamente 145 mM hasta aproximadamente 155 mM. En una de tales formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM. En otra de tales realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprenden el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente cloruro de sodio 150 mM, y aproximadamente succinato de sodio o citrato de sodio 10 mM, a un pH de aproximadamente pH 5,5.

La degradación proteica por congelación descongelación o cizallamiento mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la presente invención puede inhibirse incorporando tensioactivos en la formulación para disminuir la tensión superficial en la interfase disolución-aire. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR 5.9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, y comprende además un tensioactivo. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, un agente de isotonicidad tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, y comprende además un tensioactivo.

Los tensioactivos típicos utilizados son tensioactivos no iónicos, incluidos los ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de compuestos farmacéuticos por medio de tensioactivos o emulsivos se describe, por ejemplo, en Levine y col. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45(3): 160-165. Un tensioactivo de preferencia utilizada en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensioactivo, éste se añade típicamente en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0% (p/v), aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,5%, o aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,2%.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM; la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5; y la formulación comprende además un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0% o aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%. Tales formulaciones pueden comprender opcionalmente un agente de isotonicidad, tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 20,0 mg/ml; cloruro de sodio aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo cloruro de sodio aproximadamente 150 mM; succinato de sodio o ci-

trato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 20 mM; incluyendo succinato de sodio o citrato de sodio aproximadamente 10 mM; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0%, incluyendo aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%; donde la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

La formulación farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de conservantes y otros vehículos, excipientes, o estabilizadores señalados anteriormente en el presente documento. Como alternativa, la formulación puede incluir uno o más conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento anteriormente con la condición de que no afecten de manera adversa la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. Los ejemplos de vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables incluyen, pero no se limitan a, otros agentes tamponadores, codisolventes, tensioactivos, antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Puede encontrarse una discusión detallada de formulación y selección de vehículos, excipientes e isomolitos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

Una vez que la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descrita en el presente documento está preparada, puede liofilizarse para evitar la degradación. Los procedimientos para liofilizar composiciones líquidas son conocidos por los expertos en la técnica. Justo antes de usar, la composición puede reconstituirse con un diluyente estéril (disolución de Ringer, agua destilada o disolución salina, por ejemplo) que puede incluir otros componentes. Tras la reconstitución, la composición se administra de preferencia a los sujetos usando los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas en la fabricación de medicamentos

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer. Ejemplos de estos tumores incluyen, pero no se limitan a estos, cáncer de ovarios, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de células pequeñas del pulmón), mama, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares) gástrico, de cuello uterino, próstata, nasofaríngeal, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas (incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing).

Por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se usará antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia contra el cáncer. Los ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; cuando sea apropiado agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a estos, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antirretrovirales tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, pero no limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; terapia con citosina incluyendo, pero sin limitarse a estas, terapia con interferona-alfa, terapia con interferona-gamma, terapia con interleuquina-2 (IL-2), IL-12, IL-15 e IL-21, factor de estimulación de colonia de macrófago granulocito (GM-CSF), factor de estimulación de colonia de granulocito (G-CSF) o variantes biológicamente activas de estas citocinas; u otros anticuerpos monoclonales dirigidos al uso en el tratamiento de tumores sólidos de interés, por ejemplo, Herceptin® (Genentech, Inc., San Francisco, California), que se dirige a la proteína receptora Her2 en células de cáncer de mama Her2+; el anticuerpo monoclonal humanizado Avastin™ (también conocido como bevacizumab; Genentech, Inc., San Francisco, California), que se une e inhibe el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y es de uso en el tratamiento de cáncer de colon; anticuerpo anti-EGFR que se dirige al receptor del factor del crecimiento epidérmico (por ejemplo, IMC-C225 (ImClone Systems, Nueva York, Nueva York); anticuerpo del receptor anti-IGF-1, que se dirige a la proteína del receptor IGF-1; anticuerpo anti-MUC1, que se dirige al antígeno MUC1 asociado al tumor; anti- $\alpha 5\beta 1$, anti- $\alpha v\beta 5$, y anti- $\alpha v\beta 3$, que se dirige a aquellas integrinas respectivas, que regulan la adhesión celular y los procesos de señalización implicados en la proliferación y supervivencia celular; anticuerpo anti-P-cadherina, que se dirige a este miembro de la familia de la cadherina (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU N° 20030194406); y anticuerpo anti-VE-cadherina, que se dirige a la función relacionada angiogénica de esta molécula de adhesión específica de la célula del endotelio; donde el tratamiento con la terapia contra el cáncer adicional, o terapias contra el cáncer adicionales, tienen lugar antes, durante o a continuación del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se indicó en este documento anteriormente.

Por consiguiente, por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento por quimioterapia, seleccionándose el agente quimioterapéutico del grupo constituido por CPT-11 (irinotecano), que se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer colorrectal y cáncer de células no pequeñas del pulmón; gemcitabina, que se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer epitelial de ovarios; y otros agentes quimioterapéuticos adecuados para el tratamiento de tumores sólidos; donde el tratamiento con la terapia contra el cáncer adicional, o terapias contra el cáncer adicionales, tienen lugar antes, durante o a continuación del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se indicó en este documento anteriormente.

En otras realizaciones la invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento con al menos otro anticuerpo anti-cáncer seleccionado del grupo constituido por Herceptin® (Genentech, Inc., San Francisco, California), que se dirige a la proteína receptora Her2 en células de cáncer de mama Her2+; el anticuerpo monoclonal humanizado Avastin™ (también conocido como bevacizumab; Genentech, Inc., San Francisco, California), que se une e inhibe el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y es de uso en el tratamiento de cáncer de colon; anticuerpo anti-EGFR que se dirige al receptor del factor del crecimiento epidérmico (por ejemplo, IMC-C225 (ImClone Systems, Nueva York, Nueva York); anticuerpo del receptor anti-IGF-1, que se dirige a la proteína del receptor IGF-1; anticuerpo anti-MUC1, que se dirige al antígeno MUC1 asociado al tumor; anti- $\alpha 5\beta 1$, anti- $\alpha v\beta 5$, y anti- $\alpha v\beta 3$, que se dirige a aquellas integrinas respectivas, que regulan la adhesión celular y los procesos de señalización implicados en la proliferación y supervivencia celular; anticuerpo anti-P-cadherina, que se dirige a este miembro de la familia de la cadherina (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EEUU 20030194406); y anticuerpo anti-VE-cadherina, que se dirige a la función relacionada angiogénica de esta molécula de adhesión específica de la célula del endotelio; donde el tratamiento con la terapia contra el cáncer adicional, o terapias contra el cáncer adicionales, tienen lugar antes, durante o a continuación del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se indicó en este documento anteriormente.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 descrito en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con un tumor sólido que comprende células que expresan el antígeno CD40, en el que el medicamento se usa en un sujeto que ha recibido tratamiento previo con al menos otra terapia contra el cáncer. Por “tratamiento previo” se entiende que el sujeto ha recibido otra u otras terapias contra el cáncer (es decir, ha sido tratado con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. “Tratamiento previo” incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia contra el cáncer en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se describe en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno. No es necesario que el sujeto haya sido un paciente que responde al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o anteriores terapias contra el cáncer. Por consiguiente, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno podría haber respondido, o podría no haber respondido (es decir el cáncer era refractario), al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o a una o más terapias anteriores contra el cáncer donde el tratamiento previo comprendía múltiples terapias contra el cáncer. Los ejemplos de otras terapias contra el cáncer para las que un sujeto puede haber recibido tratamiento previo antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; cuando sea apropiado agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitarse a estas, las enumeradas anteriormente en este documento; otras terapias con anticuerpo monoclonal anti-cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a estas, los anticuerpos anticáncer enumerados en este documento anteriormente, terapia con citocina, incluyendo las terapias con citocina enumeradas en este documento anteriormente; o cualquiera de sus combinaciones.

“Tratamiento” en el contexto de uso coordinado de un medicamento descrito en el presente documento con otra u otras terapias contra el cáncer se define en el presente documento como la aplicación o administración del medicamento o de la otra terapia contra el cáncer a un sujeto, o la aplicación o administración del medicamento u otra terapia contra el cáncer a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, en el que el sujeto tiene un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40, un síntoma asociado con tal cáncer, o una predisposición a desarrollar tal cáncer, siendo la finalidad curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar el cáncer, cualquier síntoma asociado del cáncer, o la predisposición a desarrollar el cáncer.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no como limitación.

Parte experimental

Introducción

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas usados en los ejemplos a continuación son CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales (mAb) anti CD40 humano del subtipo IgG1 humana generados por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de cadena pesada de IgG1 humana y el locus de cadena ligera κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Se usaron como inmunógeno células de insecto SF9 que expresan el dominio extracelular CD40.

De forma resumida, se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma murino SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 en una relación de 10:1 usando polietilenglicol al 50% como está descrito previamente por de Boer y col. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. Las células fusionadas se resuspendieron en medio IMDM completo suplementado con hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM), y hIL-6 0,5 ng/ml (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). A continuación se distribuyeron las células fusionadas entre los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos, de manera que cada una contenía 1 hibridoma en crecimiento en promedio.

Tras 10-14 días se analizaron los sobrenadantes de las poblaciones de hibridomas para detectar la producción de anticuerpos específicos. Para la detección de anticuerpos específicos por los clones de hibridoma, se combinaron los sobrenadantes de cada pocillo y se probaron para especificidad de actividad anti-CD 40 por ELISA en primer lugar. A continuación se usaron los positivos para tinción fluorescente de células de las células B transformadas con VEB como se describió para el ensayo FACS anteriormente. Las células de hibridomas positivos se clonaron dos veces por dilución limitante en IMDM/FBS que contenía hIL-6 0,5 ng/ml.

Se fusionó un total de 31 bazos de ratones con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen el CD40 recombinante en ELISA. En promedio aproximadamente el 10% de los hibridomas producidos usando tecnología Abgenix XenoMouse® pueden contener la cadena ligera lambda de ratón en lugar de la cadena kappa humana. Se seleccionaron los anticuerpos que contenían cadena ligera lambda de ratón y se descartaron. Se seleccionó una subserie de 260 anticuerpos que también mostraban unión al CD40 de superficie celular para otro análisis. Los hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación se usaron para más caracterización en ensayos de unión y funcionales.

Se identificaron clones de otros 7 hibridomas que tenían actividad antagonista. Basado en su potencia antagonista relativa y actividades de ADCC, se seleccionaron dos clones de hibridoma para posterior evaluación. Se denominan 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10, D6.12.12 (12.12).

TABLA 1

Resumen de la serie de datos inicial con anticuerpos IgG1 anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	CMCC#	Secuencia de ADN de la región V
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Si
153.8E2	153.8E2.D10.D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Si

La línea del hibridoma 131.2F5.8.5.9 (CMCC#12047) y la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 de ratón se han depositado en la American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (EEUU)] con el Número de Depósito de Patente N° PTA-5542 y N° PTA-5543, respectivamente.

Los ADNc que codifican las regiones variables de los anticuerpos candidato se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias de aminoácido para la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 2 (cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 4 (cadena pesada para mAb CHIR-12.12). En la Figura 1B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 (véase también SEC ID N° 5), que difiere de la SEC ID N° 4 porque tiene un residuo alanina sustituido por un residuo serina en la posición 153 de SEC ID N° 4. Las secuencias de nucleótidos que codifica la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 1 (secuencia codificadora para cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 3 (secuencia codificadora para cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácido para la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 3A y 3B, respectivamente.

Véase también SEC ID N° 6 (cadena ligera para mAb CHIR-5.9) y SEC ID N° 7 (cadena pesada para mAb CHIR-5.9). En la Figura 3B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-5.9 (véase también SEC ID N° 8), que difiere de la SEC ID N° 7 porque tiene un residuo alanina sustituido por un residuo serina en la posición 158 de SEC ID N° 7.

Como se espera para los anticuerpos derivados de hibridomas independientes, hay una variación sustancial en las secuencias de nucleótidos en las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Se cree que la diversidad en la región de CDR3 de V_H determina de manera significativa la especificidad del anticuerpo.

Como se muestra por medio del análisis FACS, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen específicamente al CD40 humano y pueden prevenir la unión del ligando de CD40. Ambos mAb pueden competir con la unión previa del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular. La afinidad de unión de CHIR-5.9 al CD40 humano es de $1,2 \times 10^{-8}$ M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 al CD40 humano es de 5×10^{-10} M.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9 son fuertes antagonistas e inhiben la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de células B normales, así mismo inhiben la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de células de cáncer en pacientes NHL y CLL. *In vitro*, ambos anticuerpos matan células de cáncer primarias de pacientes NHL por ADCC. Se observó actividad anti-tumor dependiente de la dosis en un modelo de linfoma de humano de xenoinjerto.

Ejemplo 1

CD40 se expresa en una alta proporción de tumores sólidos

Se ha encontrado una variedad de líneas celulares cultivadas derivadas de tumor sólido y biopsias de paciente para expresar CD40. Se encontró que un alto % de muestras de biopsia de pacientes con cáncer de mama, pulmón, ovario, y piel expresan CD40.

Ejemplo 2

Capacidad de anticuerpo monoclonal candidato CHIR-12.12 de unirse a CD40 expresado en diversos carcinomas humanos

Se obtuvieron muestras de tejido de carcinoma de individuos (n=10) con cáncer de ovarios, pulmón, mama, o colon y se congelaron para análisis subsiguiente de unión del anticuerpo usando inmunohistoquímica. Se determinó el porcentaje de células neoplásicas en los diversos carcinomas humanos capaces de unirse a CHIR-12.12 mAb. Como se puede observar en la tabla 2, el 60% de las muestras de carcinoma de ovario y pulmón se encontraban dentro de la categoría superior de unión en porcentaje (es decir, de 50 a 100% de las células en estas muestras eran capaces de unirse a CHIR-12.12 mAb). El treinta por ciento de las muestras de carcinoma de mama y el 10% de las muestras de carcinoma de colon se encontraban en la categoría superior de la unión en porcentaje.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Capacidad de CHIR-12.12 mAb de unirse a diversos carcinomas humanos

Carcinomas	Porcentaje de células neoplásicas que se unen a CHIR-12.12 mAb				
	Negativo	< 5%	5-25%	25-50%	50-100%
Ovario <i>n</i> = 10	0%	0%	30%	10%	60%
Pulmón <i>n</i> = 10	0%	20%	20%	0%	60%
Mama <i>n</i> = 10	0%	30%	20%	20%	30%
Colon <i>n</i> = 10	0%	70%	10%	10%	10%

Ejemplo 3

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son capaces de causar citolisis de células diana que llevan CD40 por ADCC

Los anticuerpos candidatos pueden causar citolisis de células diana (líneas de linfoma y líneas de células de tumor sólido) mediante el mecanismo de ADCC. Tanto CHIR-5.9 como CHIR-12.12 son anticuerpos de isotipo IgG1 totalmente humanos y se esperan que tengan la capacidad para inducir la citolisis de células diana mediante el mecanismo de ADCC. Se probó su capacidad para causar citolisis de líneas celulares cancerosas en ensayos *in vitro*. Se seleccionaron inicialmente dos líneas celulares de linfoma humanas (Ramos y Daudi) y una línea celular de cáncer de colon humano (HCT116) como células diana para estos ensayos. Se usaron PBMC o células NK enriquecidas de 8 donadoras voluntarias normales como células efectoras en estos ensayos. Se observó mayor ADCC frente a líneas celulares de linfoma que con la línea celular de cáncer de colon. Se observó una respuesta de ADCC más potente con CHIR-12.12 comparado con CHIR-5.9 frente a las células diana de ambas líneas celulares cancerosas de linfoma. Las líneas celulares de linfoma también expresan CD20, el antígeno diana para rituximab (Rituxan®, IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California), que hizo posible la comparación de la actividad ADCC de estos dos mAb candidatos con la actividad de ADCC de rituximab. Para la diana de línea celular de linfoma, se observó una lisis específica promedio de 35%, 59% y 47% para CHIR-5.9, CHIR-12.12, y rituximab, respectivamente, cuando se usaron en una concentración de 1 µg/ml. Para diana de línea celular de cáncer de colon se observaron respectivamente una lisis específica media de 20% y 39% para CHIR-5.9 y CHIR12.12. Véase la tabla 3 siguiente. Los dos anticuerpos no mostraron mucha actividad en los ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Tabla 3. Citolisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC.

Citolisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC																
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)						Células diana: carcinoma de colon humano (HCT116)							
			CHIR-5.9			CHIR-12.12			Rituxan		Conc. Abs (vg/ml)	lisis IgG1 %	5.9		12.12	
			lisis % - lisis IgG1 %	lisis %	lisis %	lisis % - lisis 2IgG1 %	lisis %	lisis %	lisis %	lisis %			lisis % - lisis CTRL1 %	lisis %	lisis % - lisis 2CTRL %	lisis %
ADCC-005	huNK	3	17,05	5	30,75	13,70	65,22	48,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Alarmor Blue	huNK	3	40,81	5	58,62	17,81	87,87	47,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ADCC-005	huNK	2	-3,09	10	3,50	6,59	43,71	46,8	34,82	37,91	10	11,14	12,78	33,6	22,46	22,46
Alarmor Blue			-8,62	1	-10,10	-1,48	45,13	53,75	37,07	45,69	1	13,6	8,921	21,99	8,39	8,39
			-11	0,1	-14,80	-3,80	39,82	50,82	33,61	44,61	0,1	15,49	8,82	26,15	10,66	10,66
			-4,54	0,01	2,53	7,07	50,07	54,61	28,49	33,03	0,01	13,62	17,24	28,07	14,45	14,45
51Cr	huNK	5	1,5	10	32,09	30,59	47,24	45,742	ND	ND	10	33,1	120,02	86,92	170,41	137,31

Citólisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC																	
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)						Células diana: carcinoma de colon humano (HCT116)								
			CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan		Conc. Ab (µg/ml)	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %	Conc. Abs (vg/ml)	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %
			IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %	IlgG1 %									
			2,4	1	18,01	15,61	37,42	35,022	ND	ND	23,1	2	138,4	115,3	166,62	143,52	
			2,5	0,1	14,67	12,17	37,63	35,131	ND	ND	46,4	0,4	141,41	95,01	159,45	113,05	
ADCC-009	huNK	10	2,32	5	66,20	63,88	97,70	95,38	86,2	83,88	26,4	5	41,3	14,9	62,3	35,9	
Calceína AM			0,48	1	67,20	66,72	123,00	122,52	88,2	87,72	32,8	1	43,8	11	73,8	41	
			-1,43	0,2	78,40	79,83	118,00	119,43	88,8	90,23	33,5	0,2	42,6	9,1	71,4	37,9	
			3,39	0,04	69,10	65,71	109,00	105,61	84,9	81,51	26	0,04	54,8	28,8	66	40	
ADCC-011	huNK	8	3,18	1	15,36	12,19	51,59	48,42	22,44	19,27	11,63	1	6,31	-5,32	19,96	8,33	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Citotólisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC															
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)						Células diana: carcinoma de colon humano (HCT116)						
			CHIR-5.9			CHIR-12.12			Rituxan		5.9			12.12	
			lisis IgG1 %	Conc. Ab (µg/ml)	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis	lisis % - lisis
			11,95	0,001	56,81	44,86	65,17	53,22	33,07	21,12	14,63	0,001	24,68	32,53	17,9
ADCC-013	PBMC	100	2,54	1	21,03	18,49	37,94	35,40	32,28	29,74	13,53	1	22,04	43,98	30,45
51Cr			2,45	0,1	15,50	13,05	30,82	28,37	27,18	24,73	15,88	0,1	21,89	43,14	27,26
			2,92	0,01	14,53	11,61	22,59	19,67	12,79	9,87	16,85	0,01	19,75	37,16	20,31
			2,78	0,001	3,90	1,12	8,99	6,21	3,13	0,35	15,45	0,001	14,36	19,22	3,77
ADCC-014	PBM	100	4,64	10	53,54	48,90	56,12	51,48	ND	ND	24,12	10	25,24	43,09	18,97
51Cr			4,64	1	46,84	42,20	43,00	38,36	ND	ND	24,12	1	22,68	32,12	8
			4,64	0,1	45,63	40,99	39,94	35,30	ND	ND	24,12	0,1	24,95	31,48	7,36
			4,64	0,01	7,73	3,09	9,79	5,15	ND	ND	24,12	0,01	23,67	26,14	2,02
			4,64	0,001	8,83	4,19	10,81	6,17	ND	ND	24,12	0,001	21,55	21,84	-2,28
Lisis % promedio en una concentración de mAb de 1						35,31		59,03		47,23			20,12		38,68

[illegible]

Se llevó a cabo ensayo adicional de la actividad ADCC de estos dos anticuerpos anti-CD40 monoclonales en la línea celular de cáncer de colon HCT116 y otras siete líneas celulares de carcinoma, incluyendo las líneas celulares de cáncer de ovarios SKOV3 y HEY, la línea celular de cáncer escamoso de piel A431, las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB231 y MDA-MB435, y las líneas celulares de cáncer de pulmón NCI-H460 y SK-MES-1 usando los procedimientos descritos anteriormente. Como se observa en las figuras 5A-D y 6A-D, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 mostraba por lo general más actividad ADCC que el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 a cualquier concentración dada y para cualquier línea celular dada ensayada.

10 Ejemplo 4

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 muestran actividad antitumoral en modelos animales

Farmacología/eficacia in vivo

Se espera que los mAb candidatos produzcan los efectos farmacológicos deseados para reducir la carga tumoral por cualquiera de dos mecanismos antitumorales, bloqueo de la señal de proliferación/supervivencia e inducción de ADCC. Los modelos de xenoinjerto de linfoma humano disponibles en la actualidad usan líneas celulares de linfoma de largo plazo que, a diferencia de las células cancerosas primarias, no son dependientes de la estimulación de CD40 para su crecimiento y supervivencia. Por consiguiente, se espera que el componente de esta actividad antitumoral de estos mAb basado en el bloqueo de la señal de proliferación/supervivencia tumoral no contribuya a la eficacia antitumoral en estos modelos. La eficacia en estos modelos es dependiente de la ADCC, el segundo mecanismo antitumoral asociado con los mAb CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Modelos de xenoinjerto de linfoma de células B humano

Se evaluaron las actividades antitumorales de los mAb candidatos con dos modelos de xenoinjerto de linfoma humano en líneas celulares Namalwa y Daudi. Para demostrar más su actividad terapéutica, se evaluaron estos mAb en un modelo de xenoinjerto no estadificado (ie. profiláctico) y xenoinjerto estadificado (ie. terapéutico) de linfoma humano basados en la línea celular Daudi.

En resumen, se irradió el cuerpo entero de ratones desnudos deficientes en células T a 3 Gy para suprimir además el sistema inmune un día antes de la inoculación del tumor. Las células tumorales se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho a razón de 5×10^6 células por ratón. El tratamiento se inició un día después de la implantación del tumor (modelos de xenoinjerto de linfoma de células B humano subcutáneo no estadificado, Namalwa y Daudi) o cuando el volumen del tumor alcanzó 200-400 mm³ (modelo de estadificado Daudi, usualmente 15 días después de la inoculación del tumor). Se inyectaron los ratones que llevaban el tumor con los mAb anti CD40 por vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana en las dosis indicadas. Las dosis para el modelo de Namalwa no estadificado fueron como sigue: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg (mAb CHIR-12.12); 1 mg/kg (mAb CHIR-5.9); y 10 mg/kg (rituximab). Las dosis para el modelo de Daudi no estadificado fueron como sigue: 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg (mAb CHIR-12.12) y (mAb CHIR-5.9); y 10 mg/kg; 1 mg/kg (rituximab). Las dosis para el modelo de Daudi estadificado fueron como sigue: 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg (mAb CHIR-12.12); 1 mg/kg (mAb CHIR-5.9); y 1 mg/kg (rituximab). Se registraron los volúmenes tumorales dos veces por semana. Cuando el volumen del tumor en cualquier grupo alcanzó 2500 mm³, el estudio se dio por terminado. Nótese que en el modelo estadificado de Daudi, los datos de volumen tumoral se analizaron hasta el día 36 por la muerte de algunos ratones después de ese día. La regresión completa (CR) se contó hasta el final del estudio. Los datos se analizaron usando ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis y la correspondiente prueba posterior para la comparación de grupos múltiples.

En el modelo no estadificado de Namalwa, el mAb anti CD40 CHIR-12.12, pero no Rituxan® (rituximab), aumentó significativamente ($p = <0,01$) el crecimiento de los tumores de Namalwa (reducción del volumen tumoral del 60% frente al 25% para rituximab, $n = 10$ ratones/grupo) (datos no mostrados). Por consiguiente, en este modelo, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 fue más potente que rituximab. Cabe destacar que el segundo mAb candidato, CHIR-5.9, fue al menos tan eficaz como rituximab en una dosis de 1/10 de la de rituximab. Ambos mAb anti CD40, CHIR-12.12 y rituxan previnieron significativamente el desarrollo tumoral en el modelo de tumor no estadificado de Daudi (14/15 resistencia al desafío tumoral) (datos no mostrados).

Cuando estos anticuerpos monoclonales anti CD40 se compararon además en un modelo de xenoinjerto estadificado de Daudi, en el que el tratamiento comentó cuando el tumor subcutáneo era palpable, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 en una dosis de 1 mg/kg causó reducción significativa del tumor ($p=0,003$) con regresión completa del 60% (6/10), mientras que rituximab en la misma dosis no inhibió significativamente el crecimiento tumoral ni causó regresión completa (0/10) (datos no mostrados).

En resumen, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en modelos experimentales de linfoma. En la misma dosis y el mismo régimen, el mAb CHIR-12.12 mostró mejor actividad anticancerosa que Rituxan® (rituximab). Además, no se observaron signos de toxicidad en esta dosis y en este régimen. Estos datos sugieren que el mAb anti CD40 CHIR-12.12 tiene potente actividad anti linfoma humano *in vitro* y en modelos de xenoinjerto y podría ser clínicamente eficaz para el tratamiento del linfoma.

Modelo de xenoinjerto de carcinoma de colon humano

Se evaluaron adicionalmente estos mAb candidatos en relación a su actividad antitumoral terapéutica en un modelo de tumor sólido. De forma similar a muchos tumores sólidos humanos, la línea celular del carcinoma de colon humano HCT116 expresa CD40 y se seleccionó para un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon. Se inocularon células tumorales por vía subcutánea en el costado derecho de ratones desnudos deficientes en células T (este tumor puede crecer en ratones desnudos sin irradiación previa) a razón de 5×10^6 células por ratón. Un día tras la inoculación del tumor los ratones recibieron inyección por vía intraperitoneal (i.p.) de anti-CD40 mAbs una vez a la semana con un total de 5 dosis.

El tratamiento con anti-CD40 mAbs mostró una tendencia reproducible hacia la inhibición del crecimiento tumoral en dos estudios repetidos. Los datos de uno de estos dos estudios se muestran en la figura 7. De forma interesante, se observó una inversión de la actividad antitumoral con la dosis mayor (10 mg/kg) en este modelo, lo que sugiere que puede ser necesaria una dosis/régimen óptima para conseguir la mejor inhibición del crecimiento tumoral. El anticuerpo CHIR-12.12 monoclonal, que mostró mayor actividad de ADCC *in vitro* y mayor eficacia anti-tumor en un modelo de linfoma, se ensayó sólo con una dosis única de 1 mg/kg en el modelo de carcinoma de colon. Se llevó a cabo una valoración de dosis de CHIR-12.12 para determinar el potencial total de su eficacia anti-tumor en este modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano.

Modelo de cáncer de ovarios ortotópico no estadificado (profiláctico)

El CHIR-12.12 mAb se evaluó también en relación a su actividad antitumoral terapéutica en un modelo murino ortotópico no estadificado (profiláctico) de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios SKOV3i/p.1. Se inocularon células tumorales por vía intraperitoneal (i.p.) en ratones desnudos deficientes en células T a 2×10^6 células por ratón. Comenzando el primer día después de la inoculación del tumor los ratones recibieron inyecciones i.p. de diversas dosis de CHIR-12.12 mAbs o Herceptin® (Genentech, Inc., San Francisco, California), que se encuentra bajo investigación clínica para el tratamiento de cáncer de ovarios. Se dosificó el anticuerpo una vez a la semana con un total de 6 dosis. Se calculó el porcentaje de supervivencia en el tiempo.

El tratamiento con el CHIR-12.12 mAb prolongó el tiempo de supervivencia de forma dependiente de la dosis (figura 8). Cincuenta y cuatro días después de la inoculación del tumor, el porcentaje de supervivencia era significativamente mayor para el grupo que recibe 30 mg/kg del CHIR-12.12 mAb que para el grupo de control no tratado. A pesar de que una dosis similar de Herceptin® mostraba una tendencia hacia la prolongación de la supervivencia, el porcentaje de supervivencia a los 54 días tras la inoculación no era significativamente mayor que la observada para el grupo de control no tratado.

La figura 9 muestra una comparación de los efectos del CHIR-12.12 mAb en el porcentaje de supervivencia en este modelo murino ortotópico no estadificado de cáncer de ovarios cuando se administra el anticuerpo intraperitonealmente (i. p.) frente a vía intravenosa (i.v.). El protocolo de tratamiento era como se describió anteriormente. Como se puede apreciar en esta figura, la inyección por vía i.p. de CHIR-12.12 mAb dio porcentaje de supervivencia mejor respecto al observado con la administración por vía i.v. de este anticuerpo.

Modelo murino estadificado (terapéutico) de cáncer de ovarios

Se evaluaron adicionalmente los CHIR-5.9 y CHIR-12.12 mAbs en relación a su actividad anti-tumoral terapéutica en un modelo murino estadificado (terapéutico) de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios SKOV3i.p.1. Para este estudio se inocularon células tumorales por vía subcutánea en el costado derecho de ratones desnudos deficientes en células T a razón de 5×10^6 células por ratón con matrigel al 10%. Comenzando 6 días después de la inoculación del tumor (cuando el volumen de tumor alcanzó 100-200 mm³), los ratones recibieron inyecciones de estos mAbs por vía intraperitoneal una vez a la semana con un total de 4 dosis. Se midió el volumen del tumor dos veces a la semana tras el primer día de dosificación del anticuerpo.

Los dos mAbs candidatos inhibieron significativamente el crecimiento del tumor respecto al observado para el grupo de control no tratado (figura 10) a las mayores concentraciones de anticuerpo ensayadas (1 mg/kg para el CHIR-5.9 mAb, y 10 mg/kg para el CHIR-12.12 mAb). Para el CHIR-12.12 mAb (el único anticuerpo para el que se variaba la dosis), la inhibición del crecimiento del tumor tuvo lugar de forma dependiente de la dosis, con la mayor reducción de tumor sucediendo a la dosis mayor (es decir, 10 mg/kg). Con la dosis mayor el CHIR-12.12 mAb fue justamente tan eficaz como una dosis equivalente de Herceptin®.

Ejemplo 5

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a un epítipo diferente que 15B8 en CD40

Los anticuerpos monoclonales candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro por la unión al CD40 pero no con 15B8, un mAb IgG2 anti CD40 (véase la Publicación Internacional N° WO 02/28904). Se diseñaron

estudios de unión competitiva de anticuerpos usando Biacore con chips biosensores CM5 con proteína A inmovilizada por medio de acoplamiento de aminas, que se usó para capturar anti CD40, CHIR-12.12, o 15B8. Se observaron las curvas de unión de asociación/disociación normales con concentraciones variables de CD40-his (datos no mostrados). Para los estudios de competición, se capturaron CHIR-12.12 o 15B8 en la superficie de la proteína A. Posteriormente se hizo fluir un complejo CD40-his/Fab de CHIR-5.9 (CD40 100 nM; Fab de CHIR-5.9 1 μ M), en concentraciones variables, a través de la superficie modificada. En el caso de CHIR-12.12, no se observó asociación del complejo, que indica que CHIR-5.9 bloquea la unión de CHIR-12.12 a CD40-his. Para 15B8, se observó asociación del complejo Fab CHIR-5.9 que indica que CHIR-5.9 no bloquea la unión de 15B8 al sitio de unión de CD40. Sin embargo, la tasa de disociación del complejo aumentó drásticamente (datos no mostrados).

También se determinó que 15B8 y CHIR-12.12 no compiten por la unión de CD40-his. Este experimento se llevó a cabo capturando CHIR-12.12 en el chip biosensor de proteína A, bloqueando los sitios residuales de proteína A con hIgG1 control, uniendo CD40-his y a continuación haciendo fluir 15B8 sobre la superficie modificada. 15B8 se unió bajo estas condiciones indicando que CHIR-12.12 no bloquea la unión de 15B8 al CD40.

Ejemplo 6

Propiedades de unión de CHIR-12.12 y CHIR-5.9 mAb

Se inmovilizó proteína A en chips biosensores CM5 a través de acoplamiento de aminas. Se capturaron anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos, en una concentración de 1,5 μ g/ml, sobre la superficie modificada del biosensor durante 1,5 minutos a 10 μ l/min. Se hizo fluir CD40-his recombinante soluble sobre la superficie del biosensor en concentraciones variables. El anticuerpo y el antígeno se diluyeron en HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P al 20 0,005% (HBS-EP). Se determinaron las constantes cinéticas y de afinidad usando el programa informático Biaevaluation con un ajuste de interacción modelo/global de 1:1.

Como se muestra en la Tabla 4 a continuación, hay una diferencia de 121 veces en la tasa de disociación de CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que da como resultado una afinidad 24 veces mayor para CHIR-12.12.

Anticuerpo	k_a (M ⁻¹ seg ⁻¹)	k_d (seg ⁻¹)	KD (nM)
Anti-CD40,CHIR-5.9	(12,35 $\pm$ 0,64) $\times 10^5$	(15,0 $\pm$ 1,3) $\times 10^{-3}$	12,1 $\pm$ 0,35
Anti-CD40,CHIR-12.12	(2,41 $\pm$ 0,13) $\times 10^5$	(1,24 $\pm$ 0,06) $\times 10^{-4}$	0,51 $\pm$ 0,02

Ejemplo 7

Caracterización del epítipo para los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Para determinar la localización del epítipo en CD40 reconocido por los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9, se realizaron análisis SDS-PAGE y transferencia Western. Se separó CD40 purificado (0,5 μ g) en un gel NUPAGE al 4-12% bajo condiciones reductoras y no reductoras, se transfirió a membranas PVDF, y se realizó el sondeo con anticuerpos monoclonales en una concentración de 10 μ g/ml. Las transferencias se sondearon con IgG anti humano conjugada con fosfatasa alcalina y se desarrolló usando el sustrato estabilizado Azul Western® para fosfatasa alcalina (Promega).

Los resultados indican que el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR12.12 reconoce epítopos tanto en la forma no reducida como en la forma reducida de CD40, exhibiendo la forma no reducida de CD40 mayor intensidad que la forma reducida de CD40 (Tabla 15; transferencias no mostradas). El hecho de que el reconocimiento fuera positivo para ambas formas de CD40 indica que este anticuerpo interactúa con un epítipo conformacional, parte del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce principalmente la forma no reducida de CD40 sugiriendo que este anticuerpo interactúa principalmente con un epítipo conformacional (Tabla 5; transferencias no mostradas).

ES 2 348 238 T3

TABLA 5

Identificación de dominios

	Do minio 1	Do minio 2	Do minio 3	Do minio 4
mAb CHIR-12.12	-	+	-	-
mAb CHIR-5.9	-	+	-	-
mAb 15B8	+	-	-	-

Para realizar un mapa de la región antigénica en CD40, se clonaron los cuatro dominios extracelulares de CD40 y se expresaron en células de insecto como proteínas de fusión GST. La secreción de los cuatro dominios se aseguró con una señal de secreción GP67. El sobrenadante de las células de insecto se analizó por análisis SDS-PAGE y transferencia Western para identificar el dominio que contenía el epítipo.

El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítipo en el Dominio 2 tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras (Tabla 6; transferencias no mostradas). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 exhibe reconocimiento muy débil para el Dominio 2 (Tabla 6; transferencias no mostradas). Ninguno de estos anticuerpos reconoce los Dominios 1, 3 ó 4 en este análisis.

TABLA 6

Análisis del Dominio2

	R educido	No reducido
mAb CHIR-12.12	+	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

Para definir con más precisión el epítipo reconocido por el mAb CHIR-12.12, se sintetizaron péptidos del Dominio 2 extracelular de CD40, que corresponde a la secuencia PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICT (residuos 61-104 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12). Se generaron membranas de síntesis SPOTs (Sigma) conteniendo treinta y cinco péptidos 10-meros con un desplazamiento de 1 aminoácido. Se realizó el análisis de transferencia Western con mAb CHIR-12.12 y anti IgG humana marcado con beta galactosidasa como anticuerpo secundario. Se desmontó la transferencia y se volvió a sondear con mAb CHIR-5.9 para determinar la región reconocida por este anticuerpo.

Los análisis SPOTs sondando con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 en una concentración de 10 µg/ml dieron reacciones positivas con las transferencias 18 a 22. La región de la secuencia cubierta por estos péptidos se muestra en la Tabla 7.

ES 2 348 238 T3

TABLA 7

Resultados de análisis SPOTs con sondeo con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12

Número de transferencia	Región de la secuencia
18	HQHKYCDPNL (residuos 78-87 de SEC ID N°: 10 o 12)
19	QHKYCDPNLG (residuos 79-88 de SEC ID N°: 10 o 12)
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de SEC ID N°: 10 o 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de SEC ID N°: 10 o 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de SEC ID N°: 10 o 12)

Estos resultados corresponden a un epítipo lineal de: YCDPNL (residuos 82-87 de la secuencia mostrada en SEC ID N°:10 o SEC ID N° 12). Este epítipo contiene Y82, D84 y N86, que se ha predicho que están implicados en la interacción CD40-ligando de CD40.

Los análisis SPOTs con mAb CHIR-5.9 mostraron un débil reconocimiento de los péptidos representados por las transferencias 20-22 mostradas en la Tabla 8, sugiriendo implicación de la región YCDPNLGL (residuos 82-89 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12) en su unión a CD40. Debe señalarse que los mAb CHIR-12.12 y CHR-5.9 compiten uno con el otro por la unión a CD40 en el análisis BIACORE.

TABLA 8

Resultados de análisis SPOTs con sondeo con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9

Número de transferencia	Región de la secuencia
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de SEC ID N°: 10 o 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de SEC ID N°: 10 o 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de SEC ID N°: 10 o 12)

Los epítopos lineales identificados por los análisis SPOTs están dentro del módulo B1 de CD40. La secuencia del módulo B1 de CD40 es:

HKYCDPNLGLRVQKGTSETDTIC (residuos 80-103 de SEC ID N° 10 o 12).

Dentro del epítipo lineal identificado para CHIR-12.12 está C83. Se sabe que este residuo de cisteína forma un enlace disulfuro con C103. Es probable que el epítipo conformacional del mAb CHIR-12.12 contenga este enlace disulfuro (C83-C103) y/o aminoácidos vecinos conformacionalmente próximos a C103.

Ejemplo 8

CHIR-12.12 bloquea las vías de supervivencia y de señal de CD40 mediadas por CD40L en células B humanas normales

El ligando de CD40 soluble (CD40L) activa las células B e induce diversos aspectos de respuestas funcionales, incluidos el aumento de la supervivencia y la proliferación, y la activación de las vías de señales de NFκB, ERK/MAPK, PI3K/Akt y p38. Además, la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporciona señales de supervivencia por reducción de PARP escindido e inducción de proteínas antiapoptóticas, XIAP y Mcl-1, en células B normales. La estimulación de CD40 mediada por CD40L también recluta TRAF2 y TRAF3 para la unión al dominio citoplasmático de CD40.

Los siguientes estudios demuestran que CHIR-12.12 inhibió directamente todos estos efectos de la estimulación en las células B humanas normales. Por ejemplo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de caspasa-9, caspasa-3 y PARP así como la reducción de XIAP y Mcl-1 de una manera dependiente del tiempo y de la dosis, restaurando la apoptosis de las células B. El tratamiento con CHIR-12.12 también inhibió la fosforilación de I κ B cinasa (IKK) α y β (vía de NF κ B), ERK, Akt y p38 en respuesta a la estimulación de CD40 mediada por CD40L. Además, se encontró que CHIR-12.12 no provocó estos efectos apoptóticos sin la estimulación inicial de CD40 mediada por CD40L.

CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 al inducir la escisión de PARP

En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

En resumen, se observó que la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporcionó señales de supervivencia ya que no dio lugar a aumentos de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida o PARP escindida con el tiempo, indicando que las células no estaban sufriendo apoptosis. Sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado un aumento de estos productos de escisión, indicando que el tratamiento con CHIR-12.12 anuló los efectos de la unión de CD40L en las señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con cCD40L, restaurando la apoptosis de las células B (datos no mostrados).

CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de “supervivencia”

En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β actina en los lisados celulares por transferencia Western. En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado la expresión sostenida de Mcl-1 y XIAP con el tiempo. Sin embargo, el tratamiento de las células estimuladas con sCD40L con CHIR-12.12 dio como resultado una disminución en la expresión de estas proteínas con el tiempo (datos no mostrados). Como Mcl-1 y XIAP son señales de “supervivencia” capaces de bloquear la vía apoptótica, estos resultados demuestran que el tratamiento con CHIR-12.12 elimina el bloqueo contra la apoptosis en las células B normales estimuladas con sCD40L.

El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) en células B normales

En estos experimentos, se estimularon $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron los controles de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) y de IKK β total en los lisados celulares por transferencia Western.

En resumen, la estimulación por medio de sCD40L dio como resultado la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) con el tiempo; sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló esta respuesta a la estimulación de sCD40L en las células B normales (datos no mostrados).

El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 de una manera dependiente de la dosis

En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, $1,0 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a las 24 horas. Se detectaron los controles de PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de PARP en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló la vía de señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de “supervivencia” de una manera dependiente de la dosis

En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 (0,5, 2 y $10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a las 22 horas. Se detectaron los controles de Mcl-1, XIAP, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 redujo la expresión de Mcl-1 y XIAP y aumentó la expresión de PARP en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló estos bloqueos a la vía apoptótica en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

CHIR-12.12 no afecta la expresión de proteínas antiapoptóticas, PARP escindida y XIAP, en ausencia de señales de CD40L soluble

En estos experimentos, se estimularon $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control sola (es decir, las células no se estimularon previamente con sCD40L antes de añadir el anticuerpo). Las células se recogieron a las 0, 4, 14 y 16 horas. Se detectaron los controles de XIAP, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, los resultados muestran que sin estimulación de sCD40L, las células expresaron concentraciones aumentadas de PARP escindida, mientras que la expresión de XIAP permaneció constante, tanto en las células tratadas con IgG de control como en las tratadas con CHIR-12.12 (datos no mostrados). Estos datos indican que CHIR-12.12 no provoca apoptosis en las células B humanas normales sin estimulación de CD40L.

CHIR-12.12 inhibe la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser181), Akt, ERK y p38 en las células B normales

En estos experimentos, se privaron de suero en medio que contenía FBS al 1% $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos se trataron con CHIR-12.12 (1 y $10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo-IKK α , fosfo-IKK β , IKK β total, fosfoERK, ERK total, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-p38 y p38 total en los lisados celulares por transferencia Western.

En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado aumentos en la fosforilación de IKK α/β , fosforilación de ERK, fosforilación de Akt y fosforilación de p38, por consiguiente dando lugar a la supervivencia y/o proliferación de las células. El tratamiento de las células con CHIR-12.12 anuló los efectos de la estimulación de sCD40L en estas vías de señales en las células B normales (datos no mostrados).

CHIR 12.12 inhibe las vías de señales tales como PI3K y MEK/ERK en la cascada de señales de CD40

En estos experimentos, se privaron de suero en medio que contenía FBS al 1% $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos se trataron también con CHIR-12.12 (1 y $10 \mu\text{g/ml}$), Wortmanin (un inhibidor de PI3K/Akt, 1 y $10 \mu\text{M}$), LY 294002 (un inhibidor de PI3K/Akt; 10 y $30 \mu\text{M}$) y PD 98095 (un inhibidor de MEK, 10 y $30 \mu\text{g/ml}$). Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfoERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-IKK α/β y total en los lisados celulares por transferencia Western.

En resumen, los resultados muestran que CHIR-12.12 anuló la fosforilación de todas estas moléculas de transducción de señales, mientras que los inhibidores de transducción de señales mostraron sólo anulación específica de las señales, indicando que CHIR-12.12 probablemente inhibe en una etapa anterior a estas moléculas de transducción de señales mediadas por la estimulación por CD40L (datos no mostrados).

CHIR-12.12 inhibe la unión de las moléculas de señal TRAF2 y TRAF3 al dominio citoplásmico de CD40 en las células B normales

En estos experimentos, se privaron de suero durante cuatro horas en medio que contenía FBS al 1% $4,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU) durante 20 minutos. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se inmunoprecipitó CD40 usando anti CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA), y se sondeó en una transferencia Western con mAb anti TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAb anti TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA), y mAb anti CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

En resumen, los resultados muestran que TRAF2 y TRAF3 precipitaron conjuntamente con CD40 tras la estimulación de sCD40L. Por el contrario, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló la formación del complejo de señal CD40-TRAF2/3 en células B normales estimuladas con sCD40L. No hubo cambios en la expresión de CD40 (datos no mostrados).

Sin estar ligados por la teoría, los resultados de estos experimentos, y los resultados en los ejemplos resumidos anteriormente, indican que el anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti CD40 antagonista de acción dual que tiene una única combinación de atributos. Este anticuerpo monoclonal totalmente humano bloquea las vías de señales de CD40 mediadas por CD40L para la supervivencia y la proliferación de las células B; este antagonismo da lugar finalmente a la muerte celular. CHIR-12.12 también media el reconocimiento y la unión por las células efectoras, iniciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Una vez que CHIR-12.12 está unido a las células efectoras, se liberan las enzimas citolíticas, dando lugar a la apoptosis y lisis de las células B. CHIR-12.12 es un anticuerpo antitumoral más potente que rituximab cuando se compara en modelos de tumores preclínicos.

Ejemplo 9

Formulación farmacéutica líquida para anticuerpos anti CD40 antagonistas

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del pH de la disolución en la estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista CHIR-12.12 por medio de procedimientos biofísicos y bioquímicos para seleccionar el entorno de disolución óptimo para este anticuerpo. Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que la estabilidad de la conformación de CHIR-12.12 es óptima en formulaciones que tienen pH 5,5-6,5. Basado en una combinación de análisis SDS-PAGE, HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), la estabilidad fisicoquímica de CHIR-12.12 es óptima a un pH de aproximadamente 5,0-5,5. En vista de estos resultados, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en succinato de sodio aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 150 mM y que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

Materiales y procedimientos

El anticuerpo CHIR-12.12 utilizado en los estudios de formulación es un anticuerpo monoclonal humano producido por un proceso de cultivo de células CHO. Este mA b tiene un peso molecular de 150 kDa y está constituido por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas juntas por enlaces disulfuro. Está dirigido contra el receptor de CD40 de superficie celular en las células que expresan CD40, incluidas las células B normales y malignas, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes/inflamatorias.

La sustancia del fármaco anti CD40 utilizada para este estudio fue un lote a granel de anti CD40 (CHIR-12.12) purificado obtenido de células CHO. La composición de la sustancia del fármaco era de anticuerpo CHIR-12.12 9,7 mg/ml en citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, a pH 6,5. La muestra de control en el estudio era la sustancia del fármaco recibida, seguida por congelación a $\leq -60^{\circ}\text{C}$, descongelación a TA y probada junto con muestras de estabilidad en los puntos temporales predeterminados. Las muestras de estabilidad se prepararon por diálisis de la sustancia del fármaco contra disoluciones de diferentes pH y la concentración de CHIR-12.12 en cada una de las muestras se determinó por UV 280 tal como se presenta en la Tabla 9.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 348 238 T3

TABLA 9

Formulaciones de CHIR-12.12

5	Composición tampón	H	Concentración de CHIR-12.12 (mg/ml)
10	Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,5	9,0
15	Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,0	9,3
20	Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,5	9,2
25	Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,0	9,7
30	Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,5	9,4
35	Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,0	9,4
	Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,5	9,5
	Glicina 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	,0	9,5

40 La estabilidad fisicoquímica del anticuerpo CHIR-12.12 en las diversas formulaciones se ensayó usando los siguientes protocolos.

45 *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

La estabilidad conformacional de diferentes muestras de formulaciones se controló usando un MicroCal VP-DSC tras calentar de 15°C hasta 90°C a razón de 1°C/min.

50 *SDS-PAGE*

Se estimó la fragmentación y la agregación usando gel Tris-glicina al 4-20% bajo condiciones no reductoras y reductoras. Se detectaron las proteínas por medio de tinción con azul Coomassie.

55 *Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)*

La fragmentación y agregación de proteínas también se midió por medio de un sistema de HPLC Water Alliance con una columna Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL, con fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0 como fase móvil a un caudal de 0,7 ml/min.

60 *Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-H PLC)*

65 La degradación relacionada con el cambio de cargas se midió usando un sistema de HPLC Waters 600s con una columna Dionex Propac WCX-10, con HEPES 50 mM, pH 7,3 como fase móvil A y HEPES 50 mM que contenía NaCl 500 mM, pH 7,3 como fase móvil B a un caudal de 0,5°C/min.

*Resultados y discusión**Estudio de estabilidad conformacional*

El desplegamiento térmico de CHIR-12.12 reveló al menos dos transiciones térmicas, que representan probablemente el desplegamiento y fusión de los dominios Fab y Fc, respectivamente. A temperaturas más altas, la proteína presumiblemente agregó, dando lugar a pérdida de la señal de DSC. Con la finalidad de seleccionar la formulación, se definió la temperatura de transición térmica más baja como la temperatura de fusión, T_f , en este estudio. La Figura 11 muestra la temperatura de fusión térmica como una función de los pH de las formulaciones. Las formulaciones a pH 5,5-6,5 proporcionaron anti CD40 con estabilidad conformacional superior como se demuestra por las temperaturas de fusión térmica más elevadas.

Análisis SDS-PAGE

Las muestras de formulaciones de CHIR-12.12 a pH 4,5-9,0 se incubaron a 40°C durante 2 meses y se sometieron al análisis SDS-PAGE (datos no mostrados). Bajo condiciones no reductoras, se observaron especies con peso molecular (PM) de 23 kDa y 2,7 kDa en formulaciones con pH superior a 5,5, y se observaron especies con PM de 51 kDa en todas las formulaciones, pero aparecieron menos a pH 5,0-5,5. Pudo verse una especie con PM de 100 kDa a pH 7,5 y pH 9,0.

Bajo condiciones reductoras, CHIR-12.12 se redujo en cadenas pesadas y cadenas ligeras libres con PM de 50 kDa y 24 kDa, respectivamente. Las especies de 100 kDa parecieron no ser totalmente reducibles y aumentaron con el aumento del pH de la disolución, sugiriendo que podría existir asociación covalente diferente de disulfuro en las moléculas. Como había otras especies con identidades desconocidas en SDS-PAGE, la comparación de estabilidad para cada formulación se basa en la pureza restante de CHIR-12.12. Las formulaciones a pH 5,0-6,0 proporcionaron un entorno más estable para CHIR-12.12. Se detectaron pocos agregados por medio de SDS-PAGE (datos no mostrados).

Análisis SEC-HPLC

El análisis SEC-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, una especie de agregación como una especie de pico anterior separada de la especie del pico principal, una especie de fragmento grande como un pico meseta en la parte posterior de la especie del pico principal, y se detectaron especies de fragmentos pequeños posteriores a las especies del pico principal. Tras la incubación a 5°C y 25°C durante 3 meses, se detectaron cantidades insignificantes de fragmentos y agregados de proteínas (<1,0%) en las formulaciones anteriores y las especies del pico principal de CHIR-12.12 siguieron teniendo más del 99% de pureza (datos no mostrados). Sin embargo, se desarrollaron gradualmente fragmentos tras el almacenamiento a 40°C y se formaron más fragmentos a pH 4,5 y pH 6,5-9,0, como se muestra en la Tabla 21. Tras incubar las formulaciones de CHIR-12.12 a 40°C durante 3 meses, se detectó aproximadamente 2-3% de agregados en pH 7,5 y pH 9,0, mientras que se detectó menos del 1% de agregados en las formulaciones a otros pH (datos no mostrados). Los resultados de SEC-HPLC indican que CHIR-12.12 es más estable a un pH de aproximadamente 5,0-6,0,

TABLA 10

Resultados de SEC-HPLC de muestras de estabilidad de CHIR-12.12 bajo condiciones de tiempo real y de almacenaje acelerado

Muestra	Pico principal %				Fragmentos %			
	t=0	40 °C 1 m	40 °C 2 m	40 °C 3 m	t=0	40 °C 1 m	40 °C 2 m	40 °C 3 m
Control	99,4	99,2	99,9	99,5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pH 4,5	99,4	93,2	86,0	81,3	<1,0	6,4	13,2	18,1
pH 5,0	99,8	98,7	91,3	89,2	<1,0	<1,0	7,8	10,2
pH 5,5	99,8	98,9	91,4	90,6	<1,0	<1,0	7,6	8,8
pH 6,0	99,6	97,7	90,4	87,3	<1,0	1,9	8,2	11,7
pH 6,5	99,3	93,4	89,0	86,9	<1,0	5,6	9,9	12,4
pH 7,0	99,2	93,9	87,4	85,1	<1,0	5,5	11,1	13,5
pH 7,5	99,1	92,8	84,4	81,9	<1,0	6,4	12,9	16,2
pH 9,0	99,3	82,4	61,6	50,6	<1,0	15,4	36,2	47,6

Análisis CEX-FIPLC

El análisis CEX-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, las variantes ácidas eluyeron más temprano que las especies del pico principal y las variantes de adición de lisina en el extremo C terminal eluyeron después de las especies de pico principal. La Tabla 11 muestra la dependencia de los porcentajes de las especies restantes de CHIR-12.12 del pico principal y las variantes ácidas en el pH de la disolución. La muestra de control ya contenía un alto grado de especies ácidas (aproximadamente 33%), probablemente debido a los procesos de fermentación de etapa temprana y purificación. La susceptibilidad de CHIR-12.12 a las disoluciones de pH más alto se evidencia por dos hechos. Primero, la muestra de la formulación inicial a pH 9 (t = 0) ya generaba 12% más especies ácidas que el control. Segundo, el porcentaje de especies ácidas aumentó bruscamente con el aumento del pH. La degradación relacionada con el cambio de cargas se debe probablemente a la desamidación. Los datos anteriores indican que este tipo de degradación de CHIR-12.12 se redujo al mínimo a pH de aproximadamente 5,0-5,5.

TABLA 11

Porcentaje de área de picos por CEX-HPLC para CHIR-12.12 en formulaciones de diferente pH bajo condiciones de tiempo real y de almacenamiento acelerado

Muestra	Pico principal %					Variantes ácidas %				
	t=0	5 °C	25 °C	40 °C	40 °C	t=0	5 °C	25 °C	40 °C	40 °C
		3 m	3 m	1 m	2 m		3 m	3 m	1 m	2 m
Control	49,2	49,8	49,8	49,2	50,3	32,0	33,7	33,7	32,0	33,6
pH 4,5	48,5	49,7	43,7	39,7	30,0	32,5	32,6	38,0	44,2	56,4
pH 5,0	49,6	49,8	48,3	40,6	31,4	32,7	31,8	35,0	44,3	57,1
pH 5,5	50,7	50,3	48,1	40,0	30,2	32,6	31,8	37,8	48,9	63,3
pH 6,0	50,2	49,9	47,9	37,4	23,9	33,1	33,6	38,5	54,9	72,7
pH 6,5	49,4	49,9	42,3	29,7	14,6	33,3	33,6	47,7	65,2	84,6
pH 7,0	49,7	49,9	21,9	-	-	34,4	36,4	64,4	-	-
pH 7,5	49,3	48,3	12,7	-	-	35,5	40,1	79,2	-	-
pH 9,0	41,3	31,8	-	-	-	44,7	59,9	-	-	-

Conclusión

El pH tiene un efecto significativo en la estabilidad conformacional y fisicoquímica de CHIR-12.12. Se determinó que la degradación relacionada con el cambio de cargas es la principal vía de degradación para CHIR-12.12, que se redujo al mínimo a pH 5,0-5,5. En base a los datos de estabilidad general, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en succinato de sodio aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 150 mM, y que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

*Ejemplo 10**Estudios clínicos con CHIR-5.9 y CHIR-12.12**Objetivos clínicos*

El objetivo general es proporcionar una terapia eficaz para tumores sólidos que comprenden células de carcinoma que expresan CD40 convirtiéndolos en dianas con una IgG1 anti CD40. Estos tumores incluyen de pulmón, mama, colon, ovarios, y carcinomas de piel. La señal para estas enfermedades se determina en fase II aunque puede obtenerse alguna medición de actividad en fase I. Inicialmente, el agente se estudia como un agente único, pero se combinará con otros agentes, quimioterapéuticos, y otros anticuerpos a medida que proceda el desarrollo.

Fase I

• Evaluar la seguridad y la farmacocinética - aumento de dosis en sujetos con tumores sólidos anteriormente citados.

• Elegir la dosis en base a la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores séricos de CD40. En general se busca una dosis máxima tolerable (DMT) pero pueden resultar adecuadas otras indicaciones de eficacia (depleción células B CD40+, etc.) para buscar la dosis.

• Considerar más de una dosis especialmente para indicaciones diferentes, por ejemplo, la dosis para cáncer de mama puede ser diferente que para cáncer de ovarios. Por consiguiente, puede ser necesaria alguna búsqueda de dosis en fase II.

• Los pacientes se dosifican semanalmente con toma de muestras para farmacocinética (Pk) en tiempo real. Inicialmente la dosis máxima permitida es un ciclo de 4 semanas. La Pk puede ser muy variable según la enfermedad estudiada, densidad de CD40, etc.

• Este(os) ensayo(s) está(n) abierto(s) a sujetos con tumores sólidos que expresan CD40, incluyendo carcinomas de pulmón, mama, colon, ovarios, y piel.

• La decisión para interrumpir o continuar los estudios se basa en la seguridad, dosis y pruebas preliminares de actividad antitumoral.

• La actividad del fármaco, determinada por la tasa de respuesta, se determina en la Fase II.

• Identificar dosi(s) para la Fase II.

Fase II

Se iniciarán varios ensayos en los tipos de tumores mencionados anteriormente con concentración en cáncer de pulmón, ovario y mama. Puede probarse más de una dosis y más de un programa en una configuración aleatorizada de fase II.

En cada enfermedad, dirigirse a una población que ha fracasado con el tratamiento convencional actual:

• pulmón: cirugía, terapia de radiación, quimioterapia

• ovarios: cirugía, terapia de radiación, quimioterapia

• mama: cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia con hormonas

✓ La decisión para interrumpir o continuar con el estudio se basa en la prueba del concepto terapéutico en Fase II

✓ Determinar si puede usarse un marcador sustituto como indicación temprana para la eficacia clínica

✓ Identificar las dosis para la Fase III

Fase III

La fase III dependerá de cuándo se detecta la señal en la fase II y de qué terapias competidoras se consideran el patrón de referencia. Si la señal se detecta en una etapa de la enfermedad en la que no hay patrón de referencia de terapia, entonces podrá servir un estudio de un único brazo, bien controlado, como un ensayo fundamental. Si hay agentes competidores que se consideran patrones de referencia, entonces se realizan estudios directos.

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

10 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

15 c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

20 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

25 para uso en el tratamiento de un sujeto humano con un tumor sólido que comprende células del carcinoma que expresa el antígeno CD40.

30 2. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano con un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan el antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

35 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

40 b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

45 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

50 3. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan el antígeno CD40, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

55 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

60 b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

65 c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

4. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

para uso en la inhibición del crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresan antígeno CD40.

5. Uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para la inhibición del crecimiento de un tumor sólido que comprende células de carcinoma que expresa el antígeno CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa cuando se une al antígeno CD40, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

6. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo constituido por:

(i) un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de SEC ID N° 2 o SEC ID N° 6;

(ii) un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 4 o SEC ID N° 7;

(iii) un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de SEC ID N° 2 o SEC ID N° 6; y

(iv) un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 4 o SEC ID N° 7.

ES 2 348 238 T3

7. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

- (i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 2;
- (ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2;
- (iii) SEC ID N° 2;
- (iv) los residuos 20-139 de SEC ID N° 4;
- (v) los residuos 20-469 de SEC ID N° 4;
- (vi) SEC ID N° 4;
- (vii) los residuos 20-469 de SEC ID N° 5;
- (viii) SEC ID N° 5;
- (ix) los residuos 21-132 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-139 de SEC ID N° 4;
- (x) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-469 de SEC ID N° 4;
- (xi) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-469 de SEC ID N° 5;
- (xii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4; y
- (xiii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5.

8. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

- (i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 6;
- (ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6;
- (iii) SEC ID N° 6;
- (iv) los residuos 20-144 de SEC ID N° 7;
- (v) los residuos 20-474 de SEC ID N° 7;
- (vi) SEC ID N° 7;
- (vii) los residuos 20-474 de SEC ID N° 8;
- (viii) SEC ID N° 8;
- (ix) los residuos 21-132 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-144 de SEC ID N° 7;
- (x) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-474 de SEC ID N° 7;
- (xi) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-474 de SEC ID N° 8
- (xii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7; y
- (xiii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8.

9. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543.

10. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho tumor sólido se selecciona del grupo constituido por carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, cáncer de próstata,

ES 2 348 238 T3

carcinoma de células renales, carcinoma nasofaringeal, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar de tiroides
carcinoma de cuello uterino y sarcomas.

5 11. El anticuerpo, uso o procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho medicamento se administra en un
procedimiento que comprende además la administración a dicho sujeto de al menos otro protocolo de terapia contra
cáncer seleccionado del grupo constituido por cirugía, terapia con radiación; quimioterapia, terapia con citocina, u
otro anticuerpo monoclonal concebido para su uso en el tratamiento de dicho tumor sólido.

10 12. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo
monoclonal es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, en el que dicho fragmento retiene la
capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

15 13. El anticuerpo, uso o procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho fragmento de anticuerpo de unión
al antígeno se selecciona del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv y un
fragmento Fv de cadena única.

20 14. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo mo-
noclonal o su fragmento de unión al antígeno se une al antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos
 10^{-6} M.

25 15. El anticuerpo, uso o procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicho anticuerpo monoclonal o su frag-
mento de unión al antígeno se une al antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-8} M.

30 16. El anticuerpo, uso o procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo mono-
clonal o su fragmento de unión al antígeno se produce en una línea celular CHO.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

Secuencias de aminoácidos 12.12

Cadena ligera de 12.12:

líder:

MEFGLSWVFLVAAILRGVQC

variable:

**DIVMTQSPFLSLFVTPGEFASISCRSSQBLLYBNQYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNR
ASGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQARQTFFTFGGGTKVDIR**

constante:

**RTVAAPSVFIFPPSEDEQIKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKRHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC***

FIGURA 1B

Cadena pesada de 12.12:

líder:

MEFGLSWVFLVAAILRGVQC

variable:

**QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEHWVAVISYESENRY
HADEVKGRFTISRDNKITYLIQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTV
SS**

constante:

**ASTKQPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSEVTVPRSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVLPKSCDRHTCTPFCPAPELL
GGPSEVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPP
SRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSEKLT
DKSRWQQGQNVFSCSVNDEALHNHYTQKSLSLSPGK***

o

región constante alternativa:

**ASTKQPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSEVTVPRSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVLPKSCDRHTCTPFCPAPELL
GGPSEVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRRPQVYTLPP
SRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSEKLT
DKSRWQQGQNVFSCSVNDEALHNHYTQKSLSLSPGK***

FIGURA 2A

Secuencia de ADN de cadena ligera de 12.12

5'atggcgcccccgtcagctcccgggggctgolanctgcctcgggtctctggatccagtgggggatattgtagtgcacagctccac
tcacccgtaccgtcaccctggagagcccgcccccacatcctgcaggtccagtcaggtccctctgtagtgaatggatcacacat
ttgattggttaccctgtagagagccagggcagctccacaggtccctgattctcttgggtctaatcggggctccggggccctgcacag
gttcagtggtcagtggtatcgggcacnagattttacacgaaaacnngcagagtggaaggtcagggatgttgggggttatnctgcattgc
aagctcgcacaaacccattcacctcggggccctggggccaaagtggatcagagacgaactgtggctgcacccctcgtcttcattcc
cgccatcgtatggcagctgaaatcgggaactgcctctgttggctgcctgaataacttataccnagagagggccaaagiacagc
ggaaagtggtataacgcccaccatcgggttaactccagggagagtgtaoagaaggaaggaaggaaggaaggaaggaaggaaggaagga
tcagagacacccctgacgctgagcagagcagacacaggaacacaaagtcacgcctgtagatcaccatcagggccctgag
ctcggccgtcacaaagagcctcaacaggggagagtgtag3'

FIGURA 2B

Secuencia de ADN de cadena pesada de 12.12 (incluyendo intrones)

[illegible]

FIGURA 3A

Secuencia de aminoácidos para 5.9

Cadena ligera de 5.9:

líder:

NAFLAQLLGILLKLNVEGSSG

variable:

**AIYNTQPPPLSSPVTLGQPASISCRHSQSLVHSDGNTYLAWLQQRPGQPPKLLIYKFRR
LGGVFDRESGSGAGTDFTLRIERYEADVGVYYCHQVTQFPHTFGQGTREIK
constant: RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLLNNFYFREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTEQGLSSPVTKSFNRDQC***

FIGURA 3B

Cadena pesada de 5.9:

líder:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

**KVQLVQSGAEVKKPQGESLKIISCKGSGYEFTHYWIQWVRQMDQKGLEWNGI
ITPQDEPTRYSPSTFGQQTISADKSIISTAYLQWSELRAEDTAMTYCARGTAAGRDYYY
YQMDVWCQQTUVTSS**

región constante:

**ASTKGPSVFPLAPASKETSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYVDKRVEPKSCDKTHTCPFPAPPELL
GGPSVFLFPPPKKDTLMIERTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPRRE
QYNSTYRVVAVLTVLHQDWLNGKEYRCKVSNKALPAPIERTISKARGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
DKSRWQQGNVFPSCSVMEKALHNHYTQKSLSLSPGK***

o región constante alternativa:

**ASTKGPSVFPLAPSSKETSOGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYVDKRVEPKSCDKTHTCPFPAPPELL
GGPSVFLFPPPKKDTLMIERTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNKTKPRRE
QYNSTYRVVAVLTVLHQDWLNGKEYRCKVSNKALPAPIERTISKARGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
DKSRWQQGNVFPSCSVMEKALHNHYTQKSLSLSPGK**

FIGURA 4A

Secuencia codificadora para la isoforma corta de CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtcgctctc tggggctgct tgctgaccgc tgcctatcca
61 gaaccaccca ctcgatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaatgaaac ggaatgcctt
181 ccttgccgtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggtctggcag tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg gggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgcctctgca ttctgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaaggc cccaggatcg gctgagagcc ctgggtgtga tccccatcat
541 ctctgggata ctgttgcca tctcttggt gctggcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaaccaat aa

```

FIGURA 4B

Isoforma corta codificada de CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqlvds cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgr vqqkgtsed tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespaggdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq

```

FIGURA 4C

Secuencia codificadora para la isoforma larga de CD40 humano:

```

1 atgggtcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgcagaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tgcacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggttttggg gtcaagcaga ttgtacagg ggtttctgat
421 accatctgeg agccttgccc agtcggcttc ttctcaatg tgtcactgc ttctgaaaaa
481 tgtcacctt ggacaagctg tgagaccaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tcccaggat cggttgagag ccttgggtgt gatccccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catctcttg gtctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa ttctccgac
721 gatcttcctg gctccaacac tgcgtctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccacagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga

```

FIGURA 4D

Isoforma larga codificada para CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsi cqpqqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wrethchqh kyedpnlgir vqqkgtsed tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcvpgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpgd rlravvipi ifgilfail vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

```

FIGURA 5A

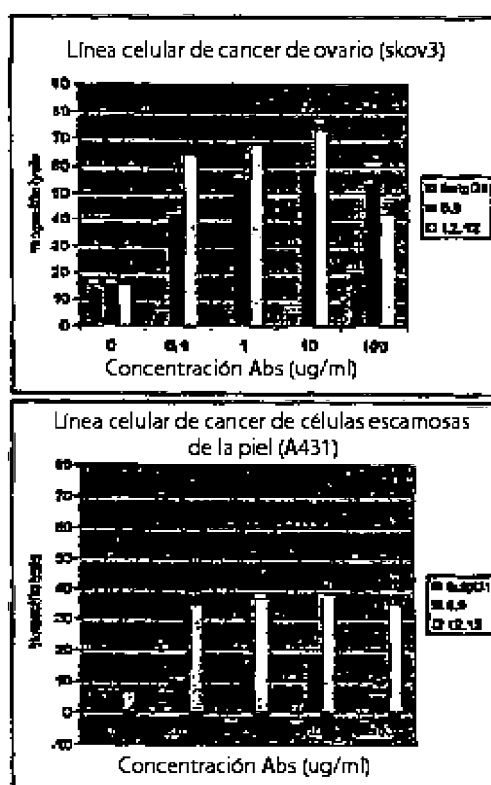


FIGURA 5B

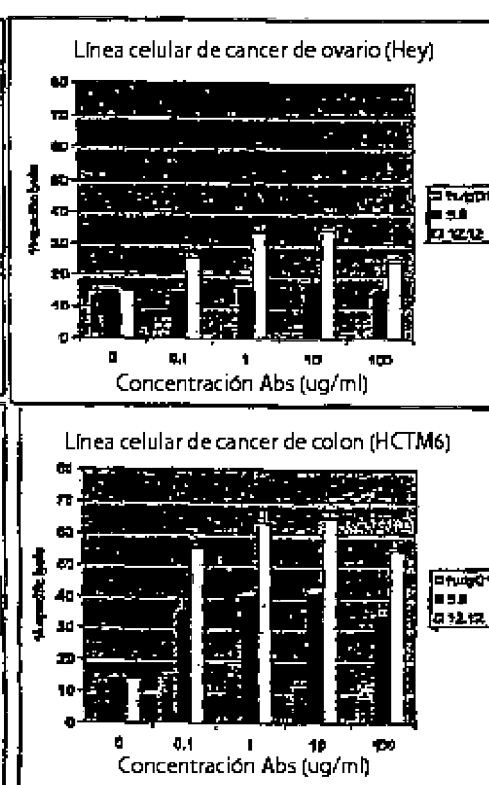


FIGURA 5C

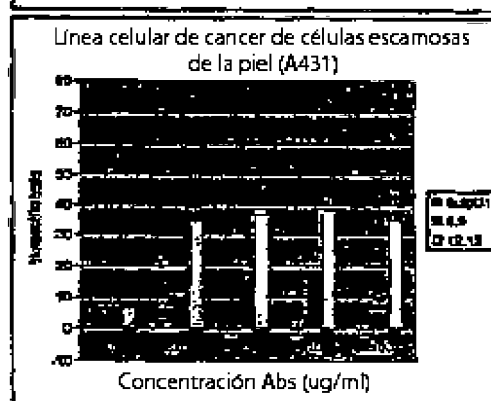


FIGURA 5D

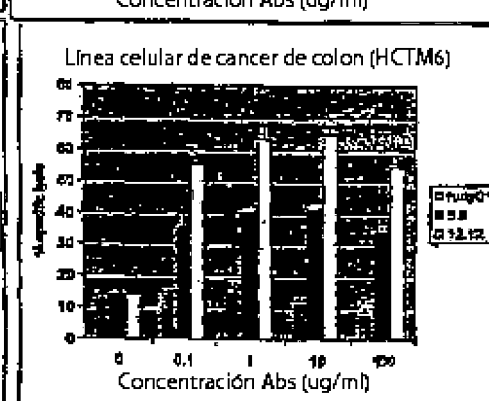


FIGURA 6A

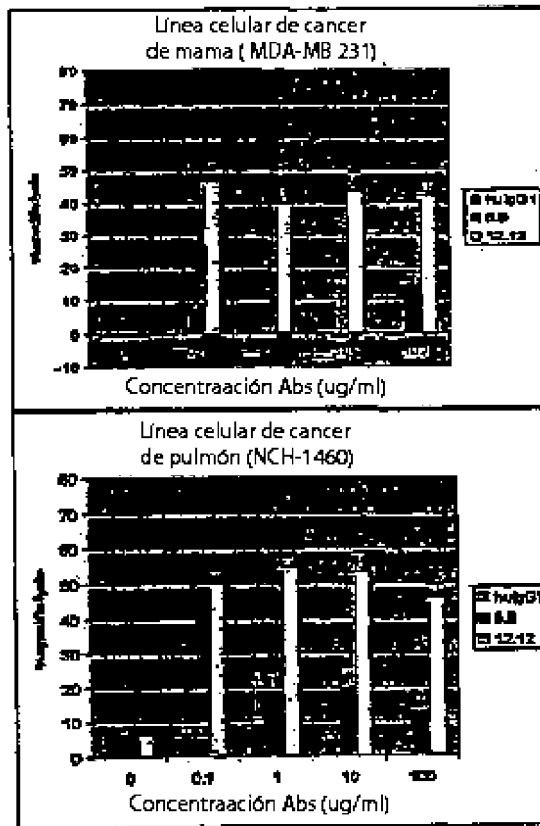


FIGURA 6B

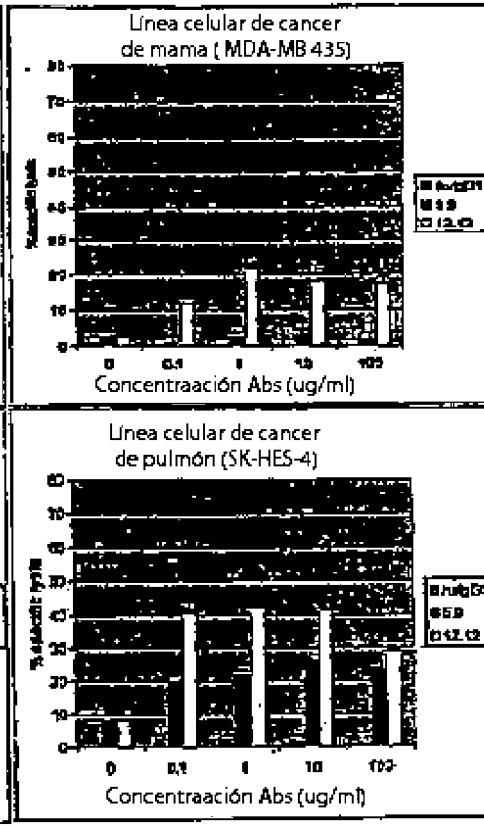


FIGURA 6C

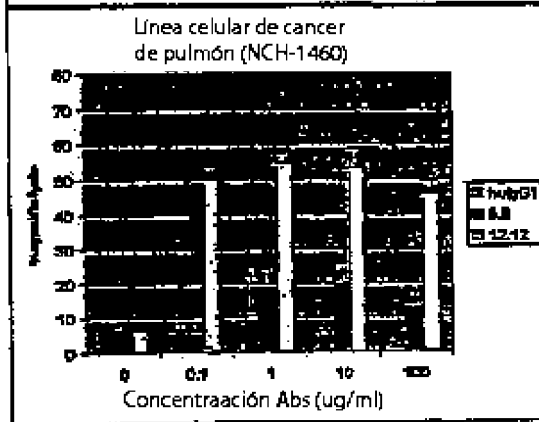


FIGURA 6D

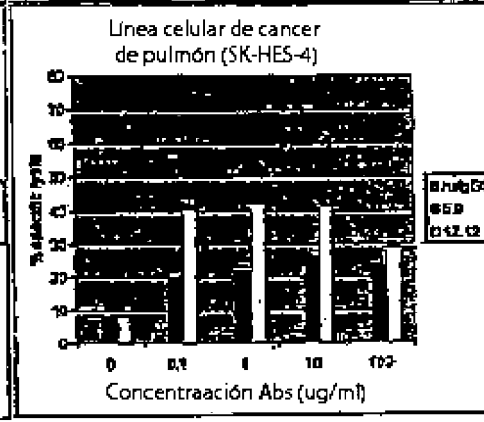


FIGURA 7

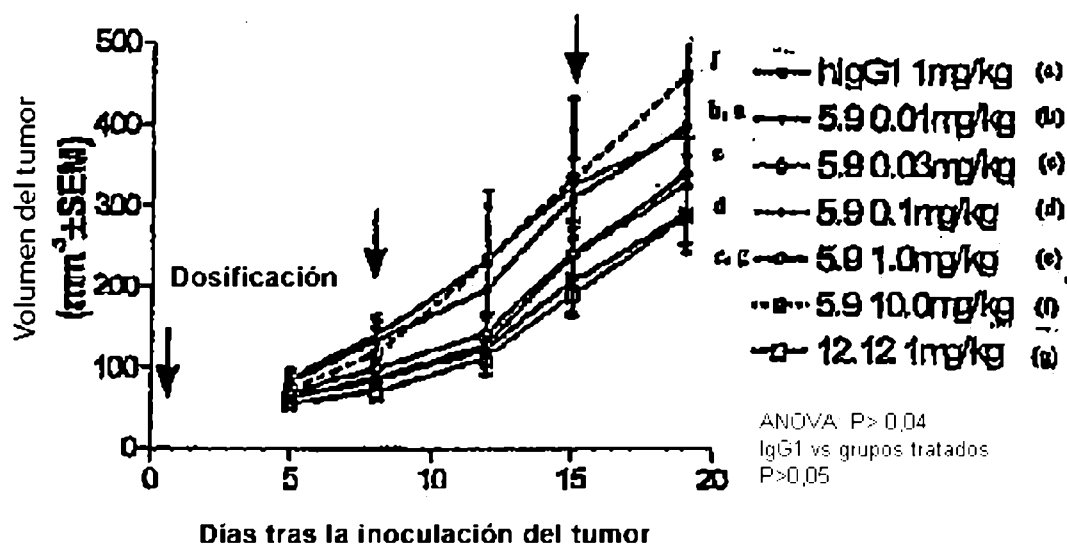


FIGURA 8

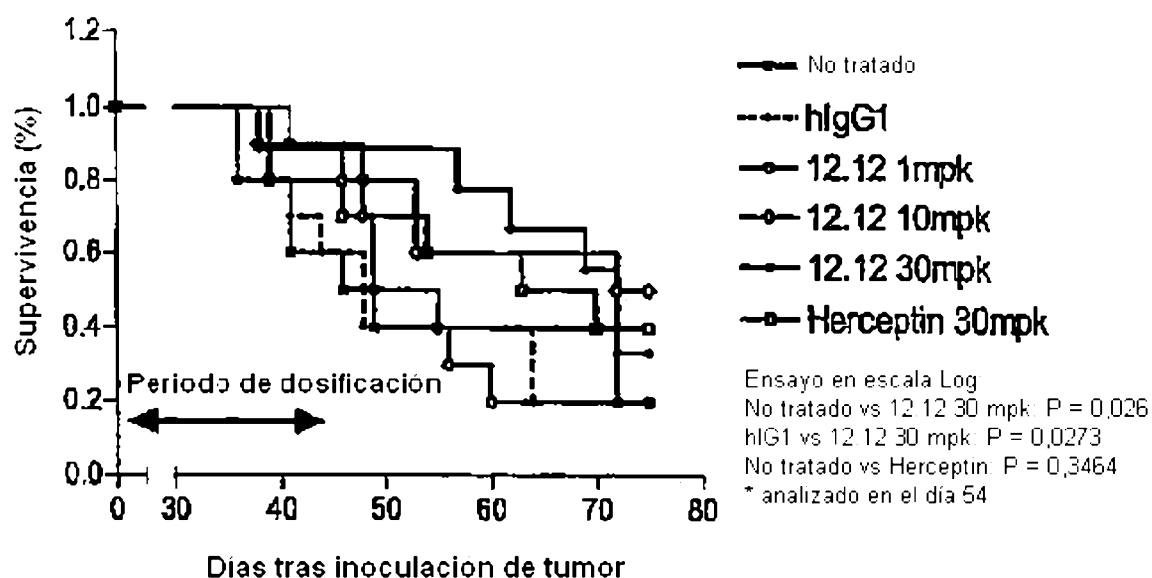


FIGURA 9

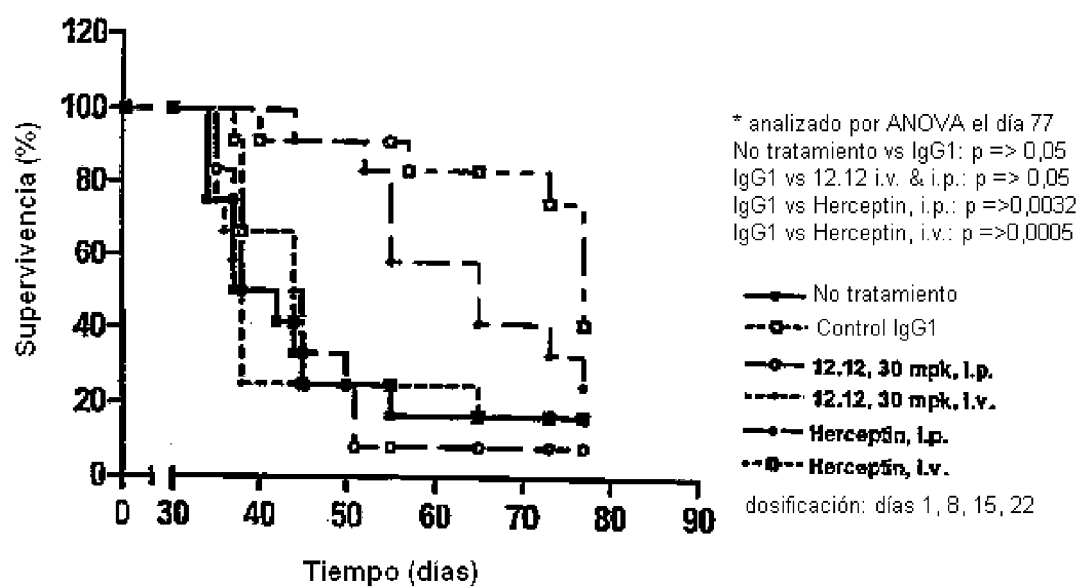


FIGURA 10

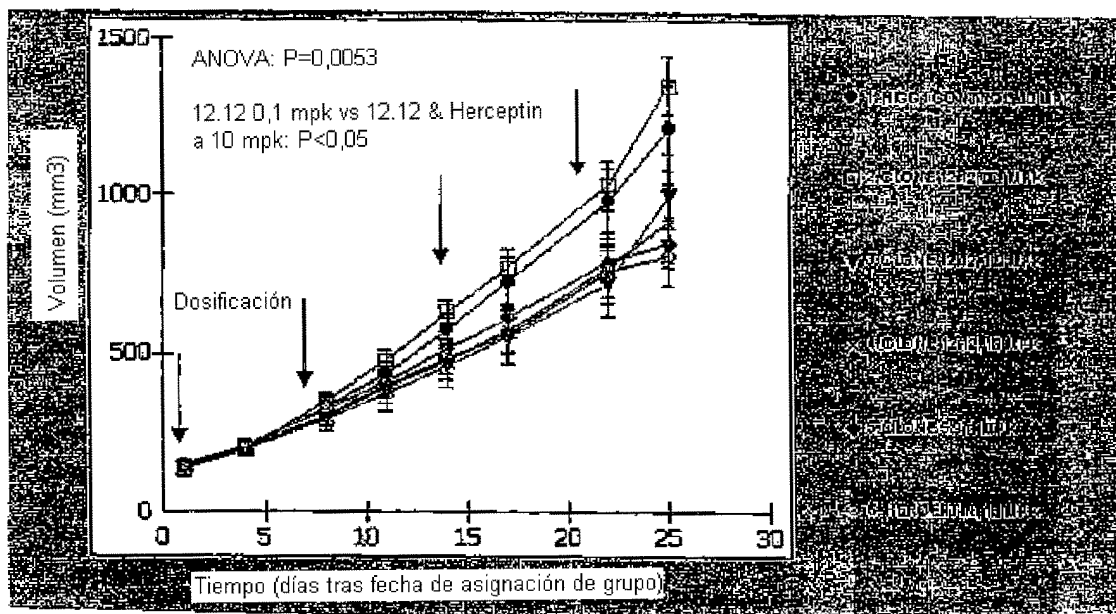
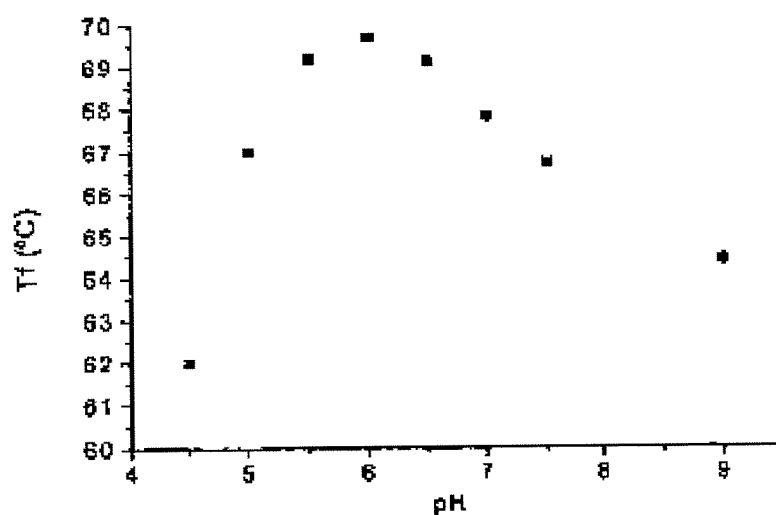


FIGURA 11



ES 2 348 238 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Long, Li Luqman, Mohammad Yabannavar, Asha Zaror, Isabel
10	<120> Uso de anticuerpos anti-CD40 monoclonales antagonistas para el tratamiento de mieloma múltiple
	<130> PP22589.002 (282915)
15	<150> 60/565.710 <151> 2004-04-26
20	<150> 60/565.710 <151> 2004-04-27
25	<150> 60/525.579 <151> 2003-11-26
	<150> 60/517.337 <151> 2003-11-04
30	<160> 12 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
35	<210> 1 <211> 720 <212> ADN <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Secuencia codificadora para cadena ligera del anticuerpo anti CD40 12.12 humano
45	<221> CDS <222> (1)...(720)
50	
55	
60	
65	

ES 2 348 238 T3

<400> 1

5	atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct	48
	Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser	
	1 5 10 15	
10	gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc	96
	Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr	
	20 25 30	
15	gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc	144
	Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
	35 40 45	
20	ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag	192
	Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys	
	50 55 60	
25	cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc	240
	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala	
	65 70 75 80	
30	tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt	288
	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
	85 90 95	
35	aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac	336
	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
	100 105 110	
40	tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa	384
	Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
	115 120 125	
45	gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg	432
	Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
	130 135 140	
50	cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg	480
	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
	145 150 155 160	
55	ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat	528
	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
	165 170 175	
60	aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac	576
	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
	180 185 190	

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 12.12 humano

ES 2 348 238 T3

<400> 2

5 Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
20 25 30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
10 Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95
15 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125
20 Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

25
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
30 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
35 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235
40

<210> 3

<211> 2016

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia codificadora para cadena pesada del anticuerpo anti CD40 12.12 humano (con intrones)

55

60

65

ES 2 348 238 T3

<400> 3

```

5      atggagtttg  ggctgagctg  ggttttccct  gttgctatct  taagaggtgt  ccagtgtcag  60
      gtgcagttgg  tggagtctgg  gggaggcgtg  gtccagcctg  ggaggtccct  gagactctcc  120
      tgtgcagcct  ctggattcac  cttcagtagc  tatggcatgc  actgggtccg  ccaggtctcc  180
      ggcaaggggc  tggagtgggt  ggcagttata  tcatatgagg  aaagtaatag  ataccatgca  240
      gactccgtga  agggccgatt  caccatctcc  agagacaatt  ccaagatcac  gctgtatctg  300
10     caaatgaaca  gcttcagaac  tgaggacacg  gctgtgtatt  actgtgcgag  agatgggggt  360
      atagcagcac  ctgggcctga  ctactggggc  cagggaaccc  tggtcaccgt  ctctcagca  420
      agtaccaagg  gcccatccgt  cttcccccct  gcgcccgtta  gcaagagcac  ctctgggggc  480
      acagcggccc  tgggctgcct  ggtcaaggac  taactccccc  aaccggtgac  ggtgtcgtgg  540
15     aactcaggcg  ccttgaccag  cggcgtgcac  accttccccg  ctgtctaca  gtctcagga  600
      ctctactccc  tcagcagcgt  ggtgaccgtg  ccttcacgca  gcttgggcac  ccagacctac  660
      atctgcaacg  tgaatcaca  gccagcaac  accaagggtg  acaagagagt  tggtgagagg  720
      ccagcacagg  gaggggagg  gtctgtctga  agccaggctc  agcgtctctg  cctggacgca  780
20     tcccggctat  gcagtcacc  tccagggcag  caaggcaggc  cccgtctgcc  tcttcacccg  840
      gaggcctctg  cccgcccac  tcatgtctag  ggagagggtc  ttctggcttt  tccccaggc  900
      tctgggcagg  cacaggctag  gtgcccctaa  cccaggccct  gcacacaaag  gggcagggtc  960
      tgggctcaga  cctgccaa  gccatctccg  ggaggacct  gccctgacc  taagcccacc  1020
      ccaaaggcca  aactctccac  tccctcagct  cggacacct  ctctctccc  agattccagt  1080
25     aactcccaat  cttctctctg  cagagcccaa  atcttgtgac  aaaactcaca  catgccacc  1140
      gtgcccagg  aagccagccc  aggcctcgcc  ctccagctca  aggcgggaca  ggtgccctag  1200
      agtagcctgc  atccagggac  aggccccagc  cgggtgctga  cacgtccacc  tccatctctt  1260
      cctcagcacc  tgaactcctg  gggggaccgt  cagtctctct  cttcccccca  aaacccaagg  1320
30     acacccctcat  gatctcccg  accctgagg  tcacatgcgt  ggtggtggac  gtgagccacg  1380
      aagacctga  ggtcaagtct  aactggtacg  tggacggcgt  ggaggtgcat  aatgccaa  1440
      caaagccgcg  ggaggagcag  tacaacagca  cgtaccgtgt  ggtcagcgtc  ctaccgtcc  1500
      tgcaccagga  ctggtgaa  ggcaaggagt  acaagtgcac  ggtctccaac  aaagccctcc  1560
35     cagcccccat  cgagaaaacc  atctccaaag  ccaaagggtg  gacccgtggg  gtgcgagggc  1620
      cacatggaca  gaggccggt  cggccccccc  tctgcccctg  gagtgcaccg  tgtaccaacc  1680
      tctgtcccta  cagggcagcc  ccgagaacca  cagggtgtaca  cctgcccccc  atcccgggag  1740
      gagatgacca  agaaccagg  cagcctgacc  tgccctggta  aaggcttcta  tcccagcgac  1800
40     atcgccgtgg  agtgggagag  caatgggcag  ccggagaaca  actacaagac  cagcctccc  1860
      gtgctggact  ccgacggctc  cttcttctct  tatagcaagc  tcaccgtgga  caagagcagg  1920
      tggcagcagg  ggaacgtctt  ctcatgtctc  gtgatgcagt  aggcctctga  caaccactac  1980
      accgagaaga  gctctcct  gtctccgggt  aaatga  2016

```

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 12.12 humano

ES 2 348 238 T3

<400> 4

	Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly
	1				5				10					15		
5	Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln
				20					25					30		
	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
			35					40					45			
10	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50					55					60				
	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala
	65					70					75					80
	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile
				85						90					95	
15	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
				100					105					110		
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr
			115				120						125			
20	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		130					135					140				
	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
	145					150					155					160
	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
				165						170				175		
25	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				180				185					190			
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			195					200					205			
30	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
		210					215					220				
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
	225					230					235					240
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
				245						250				255		
35	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260					265					270			
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		275						280					285			
40	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		290					295					300				
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
	305					310					315				320	
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				325						330				335		
45	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				340					345					350		
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
		355						360					365			
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
		370					375					380				
50	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
		385					390				395					400
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				405						410				415		
55	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				420				425					430			
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			435					440					445			
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		450					455					460				
60	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
	465															

<210> 5

<211> 469

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 348 238 T3

<220>

<223> Cadena pesada de la variante del anticuerpo anti CD40 12.12 humano

5 <400> 5

	Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Arg	Gly	
	1				5				10						15		
	Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	
10				20					25					30			
	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
			35					40					45				
	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
			50				55					60					
15	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala	
	65					70					75					80	
	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile	
					85					90					95		
20	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
				100					105					110			
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr	
			115				120						125				
	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
25		130					135						140				
	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
						150					155					160	
	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
					165					170					175		
30	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				180					185					190			
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
			195					200					205				
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
35			210				215						220				
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	
						230					235					240	
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
					245					250					255		
40	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				260					265						270		
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
			275					280					285				
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
45			290				295					300					
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
						310					315					320	
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
					325					330					335		
50	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
				340					345					350			
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
			355					360					365				
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
55							375					380					
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
						390					395					400	
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
					405					410					415		
60	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
				420					425					430			
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
			435					440					445				
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
65							455					460					
	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
	465																

ES 2 348 238 T3

<210> 6

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

10

<400> 6

```

15      Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
      1      5      10      15
      Gly Ser Ser Gly Ala Ile Val Met Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Pro
      20      25      30
      Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
20      Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg
      50      55      60
      Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Phe Phe Arg Arg Leu
      65      70      75      80
      Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe
      85      90      95
25      Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
      100      105      110
      Cys Met Gln Val Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
      115      120      125
30      Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
      130      135      140
      Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
      145      150      155      160
      Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
      165      170      175
35      Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
      180      185      190
      Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
      195      200      205
40      Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
      210      215      220
      Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      225      230      235

```

45

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

60

65

ES 2 348 238 T3

<400> 7

```

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1      5      10      15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
5      20      25      30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35      40      45
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50      55      60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
10      65      70      75      80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
85      90      95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
15      100      105      110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
115      120      125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130      135      140
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys
20      145      150      155      160
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
165      170      175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
25      180      185      190
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
195      200      205
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
210      215      220
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
30      225      230      235      240
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
245      250      255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260      265      270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
35      275      280      285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
290      295      300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305      310      315      320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325      330      335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340      345      350
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355      360      365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
40      370      375      380
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385      390      395      400
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405      410      415
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420      425      430
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435      440      445
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
450      455      460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465      470

```

<210> 8

<211> 474

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Cadena pesada de la variante del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

ES 2 348 238 T3

<400> 8

	Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Gly	
	1				5				10						15		
5	Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	
				20					25					30			
	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	
			35					40					45				
10	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
		50					55					60					
	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	
	65					70					75					80	
15	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	
				85						90					95		
	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	
				100					105					110			
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	
20			115					120					125				
	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
	130						135					140					
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	145					150				155						160	
25	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				165						170					175		
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
				180					185					190			
30	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
			195					200					205				
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
		210				215						220					
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
35		225				230					235					240	
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				245						250					255		
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				260				265						270			
40	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
			275					280					285				
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
		290				295					300						
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
45		305				310					315					320	
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				325						330					335		
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				340					345					350			
50	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
			355					360					365				
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
		370				375						380					
55	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
		385				390					395					400	
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				405					410					415			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
60				420					425					430			
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
			435					440				445					
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
		450				455					460						
65	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
	465					470											

ES 2 348 238 T3

<210> 9

<211> 612

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(612)

<221> característica miscelánea

<222> (0)...(0)

15 <223> Secuencia codificadora para la isoforma corta del CD40 humano

<400> 9

20	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc	48
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
25	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
	20 25 30	
30	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
35	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
40	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
45	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
50	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	
55	agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc	384
	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
60	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432
	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
	130 135 140	
65	ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
	145 150 155 160	
70	tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tgc gct gag agc cct ggt ggt	528
	Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly	
	165 170 175	
75	gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt	576
	Asp Pro His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly	
	180 185 190	
80	ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa	612
	Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *	
	195 200	

ES 2 348 238 T3

<210> 10
 <211> 203
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 10

 10 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

 15

 20 25 30
 20 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
 35 40 45
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
 50 55 60
 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
 25 65 70 75 80
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
 85 90 95
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
 100 105 110
 30 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
 115 120 125
 Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140
 35 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 145 150 155 160
 Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
 165 170 175
 40 Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
 180 185 190
 Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
 195 200

 45

 <210> 11
 <211> 834
 50 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 55 <221> CDS
 <222> (1)...(834)

 <221> característica miscelánea
 60 <222> (0)...(0)
 <223> Secuencia codificadora para la isoforma larga del CD40 humano

 65

ES 2 348 238 T3

<400> 11

5	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc	48
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
10	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
	20 25 30	
15	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
20	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
25	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
30	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
35	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	

40

45

50

55

60

65

ES 2 348 238 T3

5	agc gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgg ccc ggc	384
	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
10	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432
	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
	130 135 140	
15	ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
	145 150 155 160	
20	tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag	528
	Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln	
	165 170 175	
25	gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg	576
	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu	
	180 185 190	
30	aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc	624
	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile	
	195 200 205	
35	ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat	672
	Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn	
	210 215 220	
40	aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac	720
	Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp	
	225 230 235 240	
45	gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat	768
	Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His	
	245 250 255	
50	gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca	816
	Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser	
	260 265 270	
55	gtg cag gag aga cag tga	834
	Val Gln Glu Arg Gln *	
	275	
60	<210> 12	
	<211> 277	
	<212> PRT	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 348 238 T3

<400> 12

5	Met	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Cys	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr
	1				5					10					15	
	Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu
				20					25					30		
	Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val
10			35					40					45			
	Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu
		50					55					60				
	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His
15	65					70				75					80	
	Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr
				85						90					95	
	Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
20				100						105					110	
25	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
			115					120					125			
	Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu
		130					135					140				
30	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys
	145					150					155				160	
	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln
					165					170					175	
35	Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu
				180					185					190		
	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile
			195					200					205			
40	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asp
		210				215						220				
	Lys	Ala	Pro	His	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp
	225					230					235				240	
45	Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	His
					245					250					255	
	Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser
				260					265						270	
50	Val	Gln	Glu	Arg	Gln											
				275												